

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN CHRONISCH HYPOXISCHEN

FIBROBLASTEN DES CHINESISCHEN HAMSTERS

von
Reinhild Born

1974

ZELLKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN CHRONISCH HYPOXISCHEN
FIBROBLASTEN DES CHINESISCHEN HAMSTERS

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
REINHILD BORN

Berlin

Dezember 1973



1. Berichterstatter: Professor Dr. H. J. Becker
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 5. 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0005

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung meiner Arbeit im Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg möchte ich Herrn Professor Dr. med. O. Hug meinen herzlichen Dank sagen.

Herrn Professor Dr. H. J. Becker vom Zoologischen Institut der Universität München danke ich für die freundliche Befürwortung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-R. Trott, der durch fruchtbare Diskussionen und sachkundigen Rat mir manche wertvolle Anregung vermittelt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	1
II. Material und Methode	6
1. Zellkultivierung	6
1.1 Zellstamm	6
1.2 Medium	7
1.3 Zellansatz	7
1.4 Allgemeine Gesichtspunkte	8
2. Herstellung der chronischen Hypoxie	9
3. Messung der Proliferation	10
3.1 Wachstum	10
3.2 Koloniebildungsfähigkeit (Überlebensrate)	11
4. Bestimmung der Zyklusphasen	12
4.1 Theorie des Zellzyklus	12
4.2 Allgemeines zur Bestimmung der Zellzyklusparameter mit Hilfe der autoradiographischen Methode nach Markierung der Zellen mit $^3\text{HTdR}$	16
4.21 Pulsmarkierung	16
4.211 Markierungsindex	16
4.212 Kurven der markierten Mitosen	17
4.22 Dauermarkierung	20
4.221 $^3\text{HTdR}$ - Einbaurate (Bestimmung der S-Phasendauer)	21
4.2211 Allgemeines zur $^3\text{HTdR}$ - Einbaurate	22
4.2212 Einfluß der Zellprogression im Zyklus auf die Silberkorndichte	25
4.222 Bestimmung der Zellzyklusphasen mit Hilfe des Anstiegs des Markierungsindex bei Dauermarkierung	28

4.3	Technische Einzelheiten zu den Markierungsversuchen	30
4.31	Herstellung und Auswertung der Autoradiogramme	30
4.32	Kontrollen	32
4.321	Pulsmarkierung	32
4.322	Dauermarkierung	33
4.33	Hypoxische Kulturen	33
4.331	Pulsmarkierung	34
4.332	Dauermarkierung	35
4.4	Mitoseindex und Mitosedauer	35
4.41	Allgemeines	35
4.42	Bestimmung des Mitoseindex der Kontrollen und der hypoxischen Kulturen	39
4.5	Impulszytophotometer	40
4.51	Allgemeines	40
4.52	Technische Einzelheiten zur Methode	42
III.	Ergebnisse	43
1.	Morphologische und zytogenetische Einzelheiten	43
2.	Messung der Proliferation	45
2.1	Wachstum	45
2.11	Kontrollen	45
2.12	Hypoxische Kulturen	47
2.2	Koloniebildungsfähigkeit (Überlebensrate)	49
2.21	Kontrollen	49
2.22	Hypoxische Kulturen	49
3.	Zellzyklusparameter	52
3.1	Mitose	52
3.11	Mitoseindex	52
3.111	Kontrollen	52
3.112	Hypoxische Kulturen	55
3.12	Mitosedauer	57

3.121	Kontrollen	57
3.122	Hypoxische Kulturen	61
3.2	Generationszeit	64
3.21	Kontrollen	64
3.22	Hypoxische Kulturen	68
3.3	G ₂ - Phasendauer	70
3.31	Kontrollen	70
3.32	Hypoxische Kulturen	73
3.4	Markierungsindex	75
3.41	Kontrollen	75
3.42	Hypoxische Kulturen	77
3.5	³ HTdR - Einbaurrate (S - Phasendauer der hypoxischen Zellen)	79
3.6	Anstieg des Markierungsindex bei Dauermarkierung (Ableitung aller Zyklusphasen)	86
3.61	Kontrollen	86
3.62	Hypoxische Kulturen	89
3.7	Impulszytrophotometer	92
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	98
IV.	Diskussion	102
1.	Proliferation hypoxischer Zellen	102
1.1	Literaturübersicht	102
1.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse und derjenigen der Literatur im Hinblick auf die verschiedenen Methoden zur Herstellung der chronischen Hypoxie	104
2.	Koloniebildungsfähigkeit hypoxischer Zellen	114
2.1	Literaturübersicht	114
2.2	Kritische Betrachtung der aufgeführten Arbeiten unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse	117
3.	Proliferationskinetik	121

3.1	Literaturübersicht	122
3.11	Proliferationskinetik hypoxischer Zellen in vitro	122
3.12	Proliferationskinetik von Ascites Tumor- zellen bei zunehmend hypoxischen Beding- ungen	127
3.13	Vergleich der Proliferationskinetik von Tumorzellen in vitro und in der soliden Tumorform in vivo	130
3.14	Proliferationskinetik von Zellen in der stationären Wachstumsphase	132
3.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse im Ver- gleich zu den Beispielen aus der Literatur	134
3.3	Bedeutung der Ergebnisse für die Strahlen- therapie	143
V.	Zusammenfassung	151
	Literaturverzeichnis	153
	Lebenslauf	167

I. Einleitung

Die erfolgreiche Kultivierung von Säugetierzellen in vitro und die Entwicklung einer Methode, die Überlebensfähigkeit einzelner Zellen durch den Koloniebildungstest zu prüfen (Puck u.a. 1956), ermöglicht die quantitative Messung der Überlebensrate von Säugetierzellen unter verschiedenen Einflüssen.

Durch Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen gewinnt man Dosiseffektkurven, die hinsichtlich ihrer Genauigkeit qualitativ vergleichbar sind mit denen, die man schon in den 30er Jahren bei Bakterien und Viren erhalten hatte. Die Inaktivierung der Zellen nach Bestrahlung folgt einer sigmoidalen Kurve, die im halblogarithmischen Maßstab einer "Schulterkurve" entspricht (vgl. Abb. 1). So nimmt die Überlebensrate von Säugetieren nach Bestrahlung erst bei höheren Dosen exponentiell ab. Der Verlauf solcher Dosiseffektkurven wird durch bestimmte Bedingungen entscheidend beeinflusst. Von besonderer Bedeutung erwies sich die dosismodifizierende Wirkung des Sauerstoffgehalts, die von Strahlenbiologen und -therapeuten seit Beginn des Jahrhunderts vereinzelt beobachtet (Schwarz 1909, Holthusen 1921, Mottram 1936) und von Read (1952) an Pflanzenzellen und von Gray (1953) an Säugetierzellen nachgewiesen wurde. So zeigten sich Zellen, die keinen Sauerstoff zur Verfügung hatten, sog. anoxische Zellen 2-3 mal so resistent gegenüber Röntgen- oder Gammastrahlen wie gut mit Sauerstoff versorgte, sog. euoxische Zellen (vgl. Abb. 1). Zellen, die weniger gut mit Sauerstoff versorgt sind, die sog. hypoxischen Zellen, zeigen einen Sauerstoffeffekt, der geringer ist als bei anoxischen Bedingungen. Der dosismodifizierende Faktor des Sauerstoffeffekts berechnet sich aus dem Verhältnis gleich wirksamer Strahlendosen unter den verschiedenen Bedingungen. Je nach der Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt der Bestrahlung der Zellen schwankt der dosismodifi-

zierende Faktor zwischen 1 und 3 (Dewey 1960, Elkind u.a. 1965). Der halbmaximale Sauerstoffeffekt tritt bei einer Sauerstoffkonzentration von 7 - 8 $\mu\text{M}/1$ (vgl. S. 110) auf.

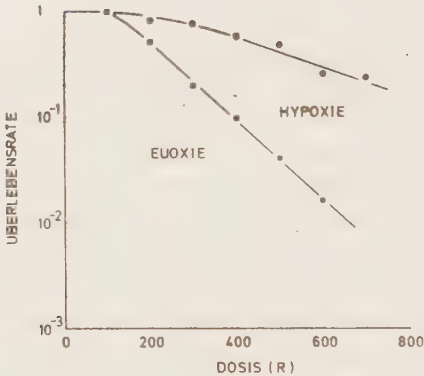


Abb. 1

Dosiseffektkurve der chin. Hamsterzellen nach Bestrahlung (300 kV Röntgenstrahlen) unter euoxischen (untere Kurve) und hypoxischen (ober Kurve) Bedingungen. Der Sauerstoffverstärkungsfaktor beträgt 2,7. Die Zellen wurden 5 h nach Beginn der Hypoxie bestrahlt und anschließend für den Koloniebildungstest ausgesät.

Ein besonderes Problem von praktischer Bedeutung stellen die anoxischen und hypoxischen Zellen in der Strahlentherapie dar. Aufgrund ihrer oft unzureichenden Gefäßversorgung besitzen die meisten im Wachstum vorgeschrittenen soliden Tumoren Bereiche, in denen die Zellen nur unzureichend oder gar nicht mehr mit Sauerstoff versorgt sind. In der

Strahlentherapie kommt es darauf an, auch die letzte überlebensfähige Tumorzelle abzutöten. Aus den Dosiseffektkurven für euoxische und hypoxische Zellen ergibt sich aber, daß bei einem Tumor, der bis zu 10 % überlebensfähige hypoxische und anoxische Zellen enthält, bei Dosen von 500 - 1000 R die Form der Kurve ausschließlich durch die Empfindlichkeit der hypoxischen oder anoxischen Zellen bestimmt ist (vgl. Abb. 2). Zur Inaktivierung aller Zellen eines Tumors mit einer Mischpopulation aus euoxischen, hypoxischen und anoxischen Zellen sind daher meist unverträglich hohe Strahlendosen notwendig (Suit 1966, Munro 1967).

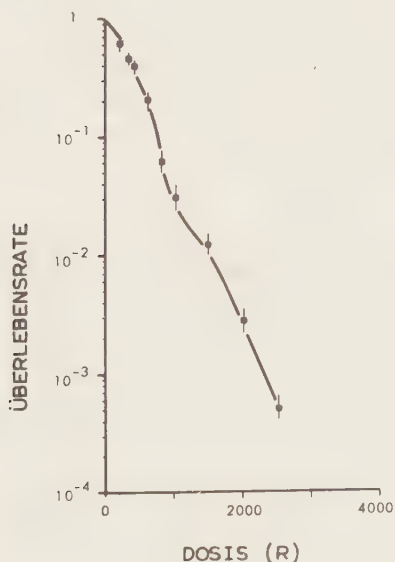


Abb. 2

Dosiseffektkurve eines experimentellen Rattentumors. Die Zellen wurden in vivo bestrahlt (300 kV Röntgenstrahlen) und in vitro auf ihre Koloniebildungsfähigkeit untersucht (aus Barendsen und Broerse 1969).

Mit zunehmendem Tumorwachstum steigt die Zahl der hypoxischen und anoxischen Zellen. Ausgedehnte autoradiographische Untersuchungen zeigten, daß gleichzeitig der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen sinkt, wobei diese euoxisch sind (Frindel 1967, Tannock 1968). Ferner steigt mit der Tumorgroße durch zunehmende Nekrose im anoxischen Tumorbereich der Zellenverlust. Da die hypoxischen und anoxischen Zellen diejenigen Zellen sind, die nach Abtötung der 3mal empfindlicheren euoxischen Zellen die Erneuerung des Tumorwachstums übernehmen können, ist es von größtem Interesse, das Ausmaß der Koloniebildungsfähigkeit, d. h. der Überlebensfähigkeit von Zellen im hypoxischen Milieu zu kennen. Die Dauer der chronischen Hypoxie dürfte dabei von entscheidender Bedeutung sein. Die bisher in der Literatur erwähnten Beispiele der Vermehrungs- und Überlebensfähigkeit chronisch hypoxischer Zellen in vitro zeigen widersprüchliche Ergebnisse (Hall u.a. 1966, Littbrand und Révész 1968, Bedford 1970, Koch und Kruuv 1971, Drew u.a. 1972 sowie Koch u.a. 1973 a, c).

Eine weitere Frage betrifft die Wachstumsaktivität hypoxischer Zellen. Wie Sinclair und Morton (1963) an chin. Hamsterzellen nachgewiesen haben, ist die Strahlenempfindlichkeit der Zellen abhängig von der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen während der Bestrahlung befinden; sie kann um einen Faktor 2 - 3 variieren. Die Form der Dosiseffektkurven asynchron wachsender Zellen wird deshalb durch den jeweiligen Anteil der Zellen in den verschiedenen Zyklusphasen, d. h. also durch die relative Dauer der Zyklusphasen beeinflusst. Es war daher wichtig, das Proliferationsverhalten und die Zellzyklusverteilung chronisch hypoxischer Zellen zu studieren, denn Veränderungen im Zellzyklus oder Auflaufen der Zellen in einer bestimmten Zyklusphase können in Verbindung mit dem Sauerstoffeffekt die Strahlenempfindlichkeit der hypoxischen Zellen vergrößern oder verkleinern.

Die Thematik der vorliegenden Arbeit bedingt die Verwendung verschiedener Methoden mit besonderen Fehlerquellen, deren Diskussion zur Erhaltung des Zusammenhanges meist schon im Ergebnisteil stattfindet, während der Diskussionsteil hauptsächlich der Besprechung der erhaltenen Ergebnisse im Vergleich zu denen in der Literatur vorbehalten wird.

1. Material und Methode

1. Zellkultivierung

1. Zellstamm

Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde die Zelllinie B - 14 F 28 des chin. Hamsters verwendet. Sie stammt von Humphrey (M.D. Anderson Hospital, Houston/Texas) und wird seit 1964 in unserem Labor kultiviert. Die Zellen sind fibroblasten-ähnlich, d. h. spindelförmig und haben eine Verdopplungszeit von 11 - 15 Stunden. Die Chromosomenzahl ist quasi-diploid; die meisten Zellen haben die Chromosomenzahl 22 (vgl. Abb. 3).

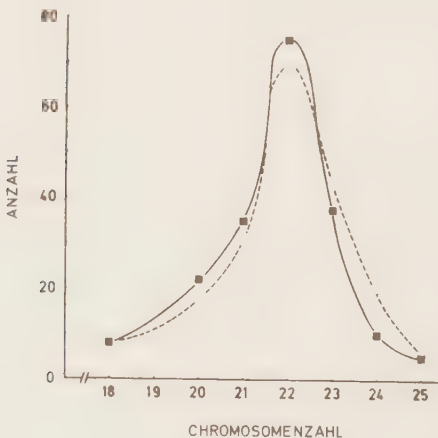


Abb. 3

Verteilung der Chromosomenzahl von 200 Metaphaseplatten unter Normalbedingungen (- ■ -) und nach 15 h chronischer Hypoxie (-- □ --).

1.2 Medium

Die Zellen wurden als Stammkulturen in G - 20 - Vierkantflaschen von Schott (180 ml) auf der Glaswand gezüchtet. Für einige Versuche wurden die Zellen auch in T₃₀ - Plastikflaschen (Falcon Plastics Gateway Intern.) oder in Glaspetrischalen kultiviert. Als Kulturmedium diente Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) mit Hank's Salzen der Fa. Serva (Heidelberg). Die Trockensubstanz wurde in aqua bidest gelöst. Pro Liter Lösung wurden 350 mg Natriumkarbonat und 100 mg Bykomycin (Neomycinsulfat) hinzugefügt. Mit 1 N Natronlauge wurde das frisch hergestellte Medium auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Durch den Indikatorfarbstoff Phenolrot, der seinen Umschlagpunkt zwischen gelb und rot bei einem pH-Wert von 7,0 besitzt, erscheint das Medium orange-rot. Das Medium wurde anschließend durch Seitz EK 1-Filterschichten mit Preßluft und 5 % Kohlendioxid steril filtriert, in sterile Blutserumflaschen abgefüllt und im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Kurz vor der Verwendung wurde das Medium mit 10 % Kalbserum (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA) versetzt.

1.3 Zellansatz

Zweimal wöchentlich mußten die Stammkulturen wegen Erschöpfung des Mediums durch Überbevölkerung und nach Stillstand der Zellvermehrung ansteigenden Sterberate neu angesetzt werden. Das Medium der 3 - 4 Tage alten Kultur wurde verworfen und durch 5 ml einer kalzium- und magnesiumfreien Hanks-Lösung ersetzt. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37° C wurde die Lösung abgegossen und 3 ml einer 0,2 %igen Trypsinlösung auf den Zellrasen gegeben. Je nach Zustand und Alter der Zellkultur runden sich die Zellen nach 5 - 10 Minuten als Reaktion auf die Andauung der Zellwände durch das Enzym ab

und lösen sich dabei von der Glaswand. Durch mehrmaliges Durchpipettieren wurden etwaige Zellverbände getrennt. Unmittelbar anschließend wurde die Zellsuspension mit Vollmedium versetzt. Das Trypsin wurde auf diese Weise verdünnt und durch den Eiweißgehalt des Serums im Medium in seiner Wirkung gestoppt. Mit einer Bürker-Blutzählkammer wurde die Zellkonzentration in der Zellsuspension bestimmt. Durch Verdünnen wurde die gewünschte Zellkonzentration erreicht. Für die Stammkulturen wurden rund $1,5 \times 10^5$ Zellen in Vierkantflaschen mit je 12 ml Vollmedium pipettiert. Die Flaschen wurden mit einer Aluminiumkappe gasdurchlässig verschlossen und in einem kontinuierlich begasten Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Begasung mit einem Gemisch aus Luft und 3 - 5 % CO_2 geschah, um die pH-Verhältnisse im Medium konstant zu halten. Das Gasgemisch wurde im Brutschrank durch Wasser geperlt und so auf einen Feuchtigkeitsgehalt von über 90 % gebracht.

1.4 Allgemeine Gesichtspunkte

Alle Glaswaren, besonders die Kulturgefäße, die zur Gewebekultur verwendet wurden, wurden sorgfältig gewaschen und anschließend bei 180°C sterilisiert. Bei allen Versuchen wurde darauf geachtet, daß möglichst die gleichen Bedingungen eingehalten wurden. Wichtig ist, daß die Temperatur und der pH-Wert sich im Laufe eines Versuches nicht ändern. Außerdem spielt die Zelldichte eine Rolle, denn sämtliche Zellparameter ändern sich, sobald die Zellkultur durch Überbevölkerung in die stationäre Wachstumsphase gelangt. Die Zelleinsaat zu Versuchsbeginn ist demnach so niedrig zu halten, daß bei Versuchsende immer noch eine exponentielle Zellvermehrung möglich ist.

2. Herstellung der chronischen Hypoxie

Zur Herstellung und Aufrechterhaltung der hypoxischen Bedingungen wird über die Zellkulturen kontinuierlich ein N_2 - CO_2 -Gasgemisch geleitet. Dabei wird nachgereinigtem N_2 -Gas der Fa. Linde mit höchstens $0,006 \mu M/l$ O_2 -Verunreinigung ca. 1 % CO_2 über ein Nadelventil zugeleitet. Das CO_2 -Gas hat eine O_2 -Verunreinigung von höchstens $0,01 \mu M/l$. Das Gasgemisch gelangt über Nylonschläuche in einen $37^\circ C$ - Wärmerraum. Dort strömt es über einen Gasdurchflußmesser (Rotameter der Fa. Rota, Oeflingen/Baden) - der Gasdurchfluß betrug $16 l/h$ - in eine Waschflasche mit Medium oder Hank's Salzlösung, die durch den Indikatorfarbstoff Phenolrot den pH-Wert anzeigt, und anschließend durch das kleinporige Filter (G 4) einer Waschflasche mit aqua bidest und wird dadurch mit Wasserdampf gesättigt. Die Waschflasche mit dem Indikatorfarbstoff dient zur erstmaligen Einstellung der genauen CO_2 -Konzentration des Gasgemisches und bewährte sich als Kontrolle. Der gewünschte pH-Wert von ca. 7,2 wird dabei durch eine bestimmte orange-rote Färbung angezeigt.

Das Gas gelangt schließlich in einen zylindrischen Verteiler aus Glas mit 18 radialsymmetrischen Ausgängen. An diese Ausgänge werden die Kulturflaschen angeschlossen. Als Verschluss dienen Silikonstopfen, durch die ein $0,4$ cm weites und $16,5$ cm langes Glasrohr führt. Mit dem $0,4$ cm weiten Glasrohr wird die Kulturflasche über ein kurzes Stück Silikonschlauch an den Gasverteiler angeschlossen. Das Gas gelangt durch das $0,4$ cm weite Rohr in die Kulturflasche und streicht über die Mediumoberfläche hinweg zurück zum $0,4$ cm weiten Ausgangsrohr.

Durch die verstärkte Glykolyse der Zellen während der hypoxischen Bedingungen reichert sich das Medium mit Milchsäure an. Eine Verminderung des pH-Wertes wird durch Gelbfärbung des Kulturmediums angezeigt. Der CO_2 -Gehalt des Gases muß daher

gegen Ende eines Versuches erniedrigt werden, um eine Übersäuerung des Mediums und damit eine Beeinträchtigung der Wachstumsaktivität der Zellen zu vermeiden.

Bevor die Kulturflaschen an den Gasverteiler angeschlossen werden, strömt das Gasgemisch 1 - 2 h durch die Waschflaschen, um den Sauerstoff herauszuverdünnen. Dann werden die Flaschen an die Apparatur angeschlossen. Nach ca. 14 h Dauerbegasung wurden die Versuche begonnen. Sofort nach Beginn der hypoxischen Bedingungen wurden die Flaschen verwendet, wenn die Überlebensrate nach zunehmender Dauer der chronischen Hypoxie bestimmt werden sollte. Da die meisten Versuche eine große Anzahl von Flaschen erforderten, wurden gleichzeitig zwei Gasverteiler mit separaten Waschflaschen und Durchflußmeßgeräten, jedoch identischer Gasquelle verwendet. Die O_2 -Konzentration des Mediums betrug nach 14stündiger Hypoxie unter $1 \mu M/l$ (vgl. S. 110 ff).

3. Messung der Proliferation

3.1 Wachstum

Die Zellvermehrung wurde eine Woche lang durch tägliche Messung der Zellzahlen in jeweils 3 verschiedenen Flaschen desselben Versuchsansatzes bestimmt. Zu Versuchsbeginn wurden etwa 50 Flaschen mit je etwa 100 000 bis 150 000 Zellen angesetzt (vgl. II/1.3). Nach 48 h wurde ein Teil der Flaschen an den Gasverteiler angeschlossen, während der andere Teil als Kontrolle diente. Ein- bis zweimal täglich wurden die Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zur Suspension gebracht (vgl. II/1.3). Zur Zellzählung wurde entweder der Coulter Counter (Coulter Electronics Limited, Model B) oder die Bürker-Blutzahlkammer verwendet.

Zur Zellzählung mit Hilfe des Coulter Counters wurden die

suspendierten Zellen mit Hank's Salzlösung auf rd. 100 000 Zellen pro ml verdünnt, um die Koinzidenzen bei der Zählung zu verringern. 15 ml dieser Lösung kamen in ein Becherglas, in das die Kapillare und die Elektrode des Zählgerätes eintauchte. Die zweite Elektrode befand sich innerhalb der Kapillare. Während jeder Messung wurden 0,5 ml der Zellsuspension durch eine 100 μ breite Öffnung in die Kapillare gesaugt. Bei der Passage einer Zelle durch die Öffnung tritt eine Widerstandsänderung ein, die als Impuls registriert wird; die Zahl der Impulse entspricht der Zahl der passierten Zellen. Der Vorteil dieses Gerätes ist, daß ein großes Lösungsvolumen gemessen werden kann. Mit der Bürker-Blutzahlkammer kann dagegen nur eine kleine Probe des Flascheninhaltes ausgewertet werden. Andererseits kann hier im Gegensatz zum Coulter Counter die Zellzahl rascher und unkomplizierter bestimmt werden. Wenn die Zellsuspension zudem gut durchmischt wird, stellt das Mittel der Zählung der beiden Felder der Blutzahlkammer meist einen ausreichend genauen Wert dar. Im Zweifelsfall wurden mehrere Blutzahlkammern verwendet. Bei allen späteren Versuchen wurde die Blutzahlkammer verwendet.

3.2 Koloniebildungsfähigkeit (Überlebensrate)

Unter günstigen Bedingungen hat nahezu jede Zelle einer permanenten Zellkultur eine unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit. Puck u.a. (1956) haben Methoden entwickelt, das Überleben von Zellen in vitro zu messen. Nach ihrer Definition hat eine Zelle überlebt, wenn sie innerhalb einer bestimmten Zeit, welche von der Generationszeit abhängt, eine Kolonie von mindestens 50 Zellen bilden, d. h. etwa 6 Zellteilungen durchmachen kann. Das Verhältnis der gewachsenen Kolonien zur Zahl der in die Flasche gegebenen Einzelzellen, die sog. "plating efficiency", abgekürzt PE, liegt auch bei Normal-

bedingungen in einer Zellkultur oft unter 100 %. Dies kann an einer inhärenten, "spontanen" Versagerwahrscheinlichkeit der Mitose oder an Störungen durch die Kulturbedingungen liegen. So können bei dem Zellneueinsatz durch die Trypsin-einwirkung einige Zellen zu stark angegriffen werden und absterben. Aber auch Änderungen in der Zusammensetzung des Nährmediums sowie geringfügige Abweichungen in den Kulturbedingungen wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur oder pH-Werte können sich nachteilig auf die PE auswirken. Bei den einzelnen Versuchen zur Testung der Überlebensrate nach Bestrahlung oder nach dem Einfluß anhaltender Hypoxie wurde daher jedesmal ein Kontrollwert mitbestimmt. Es wurde darauf geachtet, daß unabhängig von der Größe der Überlebensrate nur 200 - 300 Kolonien pro Flasche wachsen konnten. Wurde eine geringe Überlebensrate erwartet, wurden mehr Zellen in die Kulturgefäße eingesät.

Die chin. Hamsterzellen mit einer Generationszeit von 11 - 15 h bilden nach einer Woche Inkubationszeit im Brutschrank Kolonien mit bis zu 5000 Zellen, die nach Anfärbung mit Methylenblaulösung leicht mit bloßem Auge gezählt werden können. Es entstehen aber auch zahlreiche Mikrokolonien, die per Definition auch noch eine überlebende Zelle anzeigen. Die Zellzahl pro Kolonie zeigt umso größere Abweichungen von dem Mittelwert einer Kontrolle, je geringer der Prozentsatz der nach einer Vorbehandlung überlebenden Zellen ist (Nias 1968). Um diese Mikrokolonien von den abortiven Kolonien unterscheiden zu können, wurden die Flaschen unter dem Binokular ausgewertet.

4. Bestimmung der Zyklusphasen

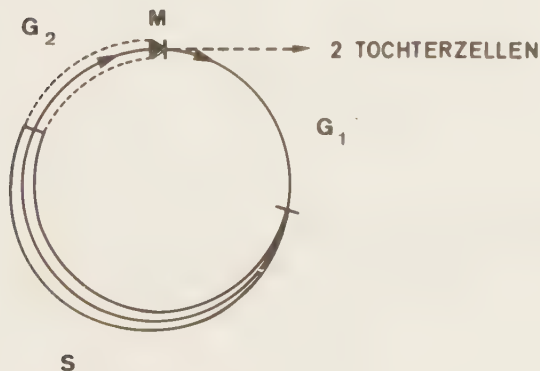
4.1 Theorie des Zellzyklus

Die Zelle durchläuft von einer Zellteilung zur nächsten die sog. Interphase, in der alle Vorbereitungen zur Teilung

des Kern- und Plasmamaterials getroffen werden. Seit Howard und Pelc (1953) ist bekannt, daß die Verdopplung der Kernsubstanz, gemessen am Einbau der Tritium-markierten Vorstufe Thymidin ($^3\text{HTdR}$), das selektiv in die DNS des Zellkerns eingebaut wird (Reichard und Estborn 1951, Friedkin u.a. 1956, Taylor u.a. 1957), auf einen bestimmten Zeitraum der Interphasen beschränkt ist. Diese DNS-Synthesephase (S - Phase) ist von der Mitose durch Zeiträume getrennt, in denen kein $^3\text{HTdR}$ eingebaut wird. Sie werden G_1 - und G_2 -Phasen genannt (nach dem ersten Buchstaben des englischen Wortes "gap" = Lücke). Auf diese Weise läßt sich der Zellzyklus, definiert als der Zeitraum zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mitosen, in 4 Phasen einteilen (vgl. Schema 1) nämlich

- 1) die G_1 -Phase, die die Zeit zwischen der Vollendung der Mitose und dem Beginn der DNS-Synthese darstellt,
- 2) die S-Phase, in der die Verdopplung der DNS stattfindet,
- 3) die G_2 -Phase, die die Zeit zwischen dem Ende der DNS-Synthese und dem Anfang der Mitose umfaßt und
- 4) die M-Phase (Mitose), in der die Trennung der Chromosomen mit den vier Stadien der Pro-, Meta-, Ana- und Telophase bis zur abgeschlossenen Zellteilung erfolgt.

Schema 1: Diagramm eines Zellzyklus

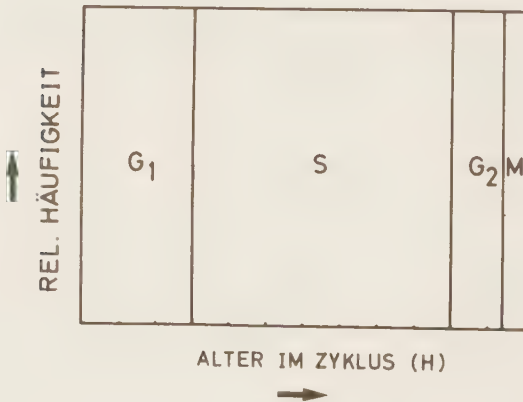


Nach jeder Mitose durchläuft entweder nur eine Tochterzelle (Schema 2a) oder durchlaufen auch beide Tochterzellen einen weiteren Zyklus (Schema 2b).

In den teilungsaktiven Geweben des wachsenden Organismus, wie z. B. der Haut, werden ständig neue Zellen gebildet, die sich differenzieren und dann absterben. Es besteht ein Fließgleichgewicht (steady-state-Wachstum), gegeben durch das Verhältnis von Zellneubildung und Absterberate. Wie Schema 2a zeigt, ist hier die Zahl der Zellen, die sich in einer bestimmten Zyklusphase befinden, proportional zur Dauer dieser Phase. Je länger eine Phase im Vergleich zur Zykluszeit dauert, umso mehr Zellen befinden sich in ihr.

Schema 2a

Zelluläres Fließgleichgewicht (steady-state-Wachstum)

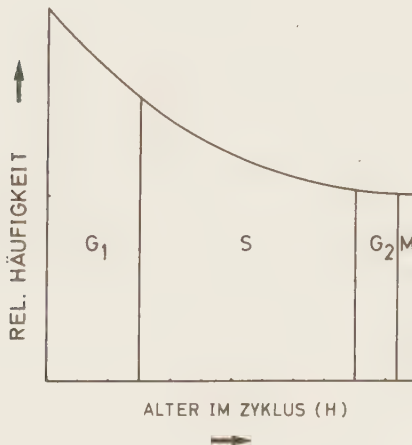


Trägt man die Häufigkeit der Zellen in Abhängigkeit von der Zykluszeit auf, so wird aus der rechteckigen Form der Alters-

verteilung deutlich, daß die Wahrscheinlichkeit, sich in einem bestimmten Abschnitt des Zellzyklus zu befinden, für alle Zellen jederzeit gleich groß ist.

Anders verhält es sich bei der exponentiell wachsenden Zellpopulation. Hier treten nach jeder Zellteilung beide Tochterzellen in einen weiteren Zellzyklus ein. Es findet laufend eine Zellzunahme statt, die einer Exponentialfunktion folgt, da die Zahl der sich bei einer Teilung verdoppelnden Zellen immer größer wird. Dies bedeutet, daß in der Population die Zahl der jungen Zellen, d. h. die Zahl der frisch geteilten Zellen immer größer ist als die Zahl der kurz vor der Teilung stehenden Zellen. Die Altersverteilung dieser Population zeigt einen abfallenden Verlauf vom Anfang (G_1 -Phase) bis zum Ende des Zellzyklus (M-Phase), wie Schema 2b zeigt.

Schema 2b
Exponentielles Wachstum



In diesem Fall ist zwar die Zahl der Zellen pro Zyklusphase proportional zur Dauer der einzelnen Phase. Die Zahl der Zellen, die sich in einem bestimmten Abschnitt des Zellzyklus befinden, ist jedoch nicht mehr gleich groß. Die Häufigkeit der Zellen nimmt mit ihrem zunehmenden Alter nach einer Exponentialfunktion ab (Steel 1968, Maurer und Schultze 1968).

4.2 Allgemeines zur Bestimmung der Zellzyklusparameter mit Hilfe der autographischen Methode nach Markierung der Zellen mit $^3\text{HTdR}$

Werden Zellen in einer Lösung mit radioaktiv markiertem Thymidin, z. B. $^3\text{HTdR}$, inkubiert, so wird diese nur von Zellen inkorporiert, die sich in der DNS-Synthesephase befinden. Diese markierten Zellen können infolge des radioaktiven Zerfalls des ^3H -Atoms einen Film schwärzen und lassen sich dadurch von den Zellen unterscheiden, die kein $^3\text{HTdR}$ inkorporiert haben. Bei der Pulsmarkierung, d. h. der kurzfristigen Inkubation in der aktiven Lösung, wird die Zellpopulation also in markierte und unmarkierte Zellen geteilt. Der prozentuale Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzellpopulation - der Markierungsindex - ist ein relatives Maß der DNS-Synthesedauer.

Werden Zellen längere Zeit in $^3\text{HTdR}$ inkubiert, so nimmt die Zahl der markierten Zellen mit der Inkubationszeit zu und zwar entsprechend der Geschwindigkeit des Einstromes der Zellen in die S-Phase (Dauermarkierung).

4.21 Pulsmarkierung

4.211 Markierungsindex

Der Markierungsindex ist in einem Fließgleichgewicht (steady-state-Wachstum) der Zellpopulation direkt proportional

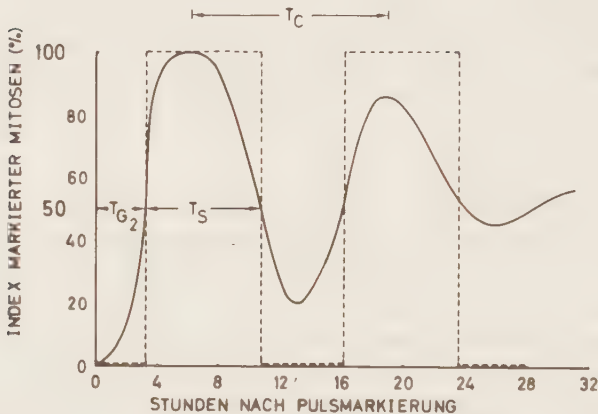
zur DNS-Synthesedauer, während bei exponentieller Zellzunahme der Population ein Korrekturfaktor eingeführt werden muß (vgl. S. 20). Unter Normalbedingungen ist der Markierungsindex konstant. Änderungen des Markierungsindex im Verlaufe eines Versuches zeigen Verschiebungen in der Verteilung der Zellen auf die Zyklusphasen an, die vorübergehend oder dauerhaft sein können.

4.212 Kurven der markierten Mitosen

Die markierten S-Phasezellen können auf ihrem Weg durch den Zellzyklus beobachtet werden, indem man das Erscheinen und Verschwinden der Zellkohorte in der Mitose mißt; dazu bestimmt man den Prozentsatz der markierten Mitosen zu verschiedenen Zeiten nach der Pulsmarkierung (vgl. Schema 3). Zunächst erscheinen nur vereinzelt markierte Zellen in der Mitose, da die markierten Zellen der S-Phase vor ihrer Teilung erst die G_2 -Phase durchlaufen müssen, welche eine gewisse Streuung in ihrer Dauer aufweist. Alle unmarkierten Mitosen stammen also von den einwandernden G_2 -Phasezellen, d. h. Zellen, die zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung die S-Phase schon verlassen haben. Sobald die markierten Zellen, die G_2 -Phase vollendet haben, steigt der Prozentsatz markierter Mitosen rasch auf den 100%-Wert an (1. Maximum) und fällt erst wieder ab, wenn die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung in der G_1 -Phase befanden, durch die S- und G_2 -Phase in die Mitose gelangt sind. Wegen der Variationsbreite der Generationszeiten der einzelnen Zellen sinkt der Prozentsatz markierter Mitosen nicht auf Null, sondern nur auf 10 - 30 %. Es folgt ein weiterer Anstieg und Abfall des Prozentsatzes markierter Mitosen mit dem Beginn und der Vollendung der zweiten Teilung der markierten Zellen (vgl. Schema 3).

Schema 3

Kurve der markierten Mitosen



Dieses 2. Maximum der Kurve erreicht nicht mehr die 100 %-Grenze, da eine zunehmende Überlagerung der Phasen der markierten Zellen durch die unterschiedlichen Generationszeiten zu beobachten ist. Diese Desynchronisation der markierten Zellkohorte geht so weit, daß ein 3. Maximum in den meisten Fällen nicht mehr entstehen kann. Es genügen jedoch die ersten beiden Gipfel der Kurve, um Rückschlüsse auf die Generationszeit (T_C), die S-Phasendauer (T_S), die G_2 -Phasendauer (T_{G_2}) und die Länge der G_1 -Phase (T_{G_1}) ziehen zu können.

Die Größe der Generationszeit kann direkt aus dem Abstand zwischen den beiden Maxima oder, falls diese so breit sind, daß der Kulminationspunkt nicht genau meßbar ist, aus der Zeitdifferenz zwischen den beiden Werten für 50 % markierte Mitosen in dem aufsteigenden Ast der beiden Maxima bestimmt werden. In einer exponentiell wachsenden Zellkultur ist

diese Zeitspanne von einer Teilung zur nächsten identisch mit der Verdopplungszeit, vorausgesetzt daß sich alle Zellen im Zyklus befinden und jede Zellteilung erfolgreich ist. Die Methode zur Bestimmung der Kurve der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung hat den Vorteil, daß sie im Gegensatz zu anderen Methoden, wie z. B. Doppelmarkierung, unabhängig von dem Anteil der zyklierenden Zellen und weniger anfällig gegenüber einer Teilsynchronisation ist.

Auch die Dauer der G₂-Phase läßt sich direkt aus dem Verlauf der Kurve der markierten Mitosen bestimmen. Die mittlere G₂-Phasenlänge entspricht der Zeit, die nach der Pulsmarkierung vergeht, bis 50 % aller Mitosen markiert sind, d. h. die Hälfte der G₂-Phasenzellen in der Mitose angelangt ist. Die Schwankungsbreite der G₂-Phasenlängen wird durch die Zeit zwischen den Werten von 0 - 100 % markierter Mitosen im ansteigenden Ast des 1. Maximums angegeben. Durch die erste Ableitung der Summationskurve kann die Art der Verteilung verdeutlicht werden. Das Maximum dieser Verteilung ist mit dem Mittelwert der G₂-Phasenlängen identisch, wenn es sich um eine Normalverteilung handelt.

Zur Bestimmung der G₂-Phasendauer können auch diejenigen Kurven verwendet werden, die nach Dauermarkierung entstehen und die nur den ersten Anstieg des Prozentsatzes der markierten Mitosen zum 100 %-Wert beschreiben. Solange die Dauer der längsten G₂-Phase nicht die Dauer der kürzesten S-Phase überschreitet, besteht kein Unterschied zwischen dem Anstieg des Prozentsatzes der markierten Mitosen nach Puls- und nach Dauermarkierung.

Die Dauer der S-Phase entspricht der Zeitdifferenz zwischen den Werten der zu 50 % markierten Mitosen des auf- und absteigenden Astes des 1. Maximums der markierten Mitosenkurve. Der Wert der S-Phasendauer (T_S) läßt sich mit

Hilfe des Markierungsindex (LI = Labeling Index) nach Pulsmarkierung und der Generationszeit (T_C) aus der Beziehung $LI = T_S \times 100/T_C$ (%) überprüfen, wobei bei exponentiellem Wachstum der Zellkultur und bei großen Unterschieden in der Länge der G_1 - und G_2 -Phasen die Altersverteilung berücksichtigt werden muß:

$$T_S = \frac{LI \times T_C}{100 \times \lambda}$$

λ ist ein Faktor, der sich dem Wert $\ln 2$ annähert, wenn die S-Phase sich eng an das Zyklusende anschließt, d. h. die G_1 -Phase sehr klein ist (Steel 1968). λ hat den Wert 1, wenn die Dauer der G_1 - und die Dauer der G_2 - und M-Phasen etwa gleich ist. Bei den Kontrollkulturen ist $\lambda = 0,9$, da die S-Phase etwas über die Hälfte der gesamten Zyklusdauer einnimmt und in der Altersverteilung leicht zur Mitose hin verschoben ist.

Die Länge der G_1 -Phase läßt sich nur aus der Differenz zwischen den ermittelten Einzelphasen und der Generationszeit berechnen: $T_{G1} = T_C - (T_S + G_2 + M)$.

Die Mitosedauer ist zu gleichen Teilen auf die G_1 - und die G_2 -Phase aufgeteilt, da die Zellen der Metaphase ausgewertet werden. Diese liegt etwa in der Mitte der Mitose. Aus dem Verlauf der Kurve der markierten Mitosen lassen sich keine Aussagen über die Mitosedauer machen.

4.22 Dauermarkierung

Die Methode der Messung der Kurve der markierten Mitosen ist nur begrenzt anwendbar, da eine ausreichende mitotische Aktivität der Zellpopulation die Voraussetzung ist. Außerdem können mögliche Flußratenänderungen innerhalb der Population,

d. h. Änderungen der Durchlaufgeschwindigkeit der Zellen durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus bei langer Versuchsdauer das Ergebnis verfälschen. Sicherer und einfacher ist es, mit Hilfe der Dauermarkierung über einen kurzen Zeitraum Fluß- und Einbauraten zu bestimmen, um Auskunft über die Einzelheiten des Zellzyklus zu erhalten. Es wird dabei der Anteil der markierten Interphasezellen sowie der markierten Mitosen an der Gesamtzellpopulation bei zunehmender Dauer der Inkubation in $^3\text{HTdR}$ gemessen.

4.221 $^3\text{HTdR}$ -Einbauraten (Bestimmung der S-Phasendauer)

Bei der Dauermarkierung erhöht sich mit der Inkubationszeit der Zellen in $^3\text{HTdR}$ nicht nur die Zahl der markierten Zellen, sondern auch die mittlere pro Zelle aufgenommene Aktivitätsmenge. Je höher dadurch die spezifische Aktivität der DNS wird, desto dichter wird bei gleicher Expositionszeit die Silberkornzahl über den Zellkernen im Autoradiogramm. Durch Ermittlung der durchschnittlichen Silberkornzahl pro Kern in der asynchronen Population zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Dauermarkierung läßt sich die Einbaugeschwindigkeit von $^3\text{HTdR}$ in die DNS bestimmen; die mittlere Einbauraten ist umgekehrt proportional zur Dauer der DNS-Synthese. Änderungen der mittleren Einbauraten lassen auf Unterschiede in der S-Phasendauer schließen. Wenn die Dauer der S-Phase von Zellen unter Normalbedingungen ($T_{\text{S Kontr.}}$) und ihre Einbauraten ($\text{Einbauraten}_{\text{Kontr.}}$) bekannt sind, läßt sich die DNS-Synthesezeit von Zellen unter hypoxischen Bedingungen ($T_{\text{S Hyp.}}$) mit Hilfe ihrer Einbauraten ($\text{Einbauraten}_{\text{Hyp.}}$) errechnen:

$$T_{\text{S Hyp.}} = \frac{T_{\text{S Kontr.}} \times \text{Einbauraten}_{\text{Kontr.}}}{\text{Einbauraten}_{\text{Hyp.}}} \quad (\text{h})$$

4.2211 Allgemeines zur $^3\text{HTdR}$ -Einbaurrate

Die Zunahme der DNS der Zellen pro Zeiteinheit während der S-Phase ist umgekehrt proportional zur Synthesedauer. Wird den Zellen $^3\text{HTdR}$ angeboten, so wird ein gewisser Prozentsatz dieses exogenen Thymidins eingebaut, bei Hela-Zellen 6,7 % (Müller 1969). Die Menge der eingebauten Aktivität hängt von der spezifischen Aktivität des angebotenen Thymidins und der Einbaugeschwindigkeit ab. Nach Cleaver und Holford (1965) und Lang u.a. (1968) ist der $^3\text{HTdR}$ -Einbau proportional zur Konzentration des $^3\text{HTdR}$, solange sie nicht über 10^{-6} molar ist, d. h. nicht mehr als $0,5 \mu\text{g/ml}$ TdR enthält. Wenn die Sättigung des TdR-Pools erreicht ist, biegt die Anstiegsgerade zum Plateau ab. Alle Versuche wurden mit TdR-Konzentration durchgeführt, die weit unter dieser Grenze lagen, so daß die Einbaurrate, gemessen an der mittleren Silberkornzahl pro Kern, bei sonst gleichen Bedingungen linear mit der $^3\text{HTdR}$ -Konzentration ansteigt (vgl. Abb. 4). Die Gerade führt nicht durch den Nullpunkt, da die Hintergrundschwärzung etwa 5 Silberkörner pro Kern beträgt.

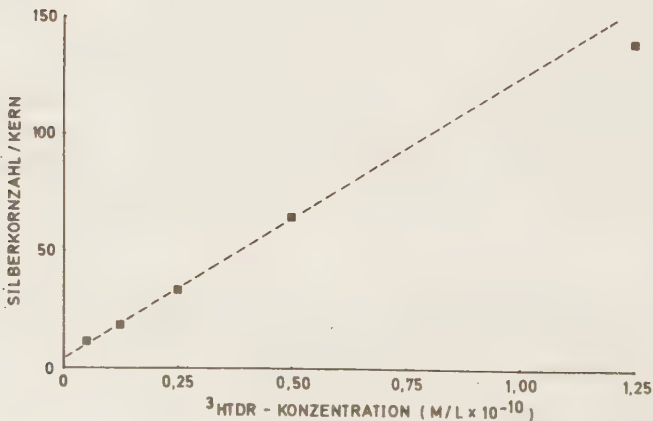


Abb. 4: Zunahme der mittleren Silberkornzahl pro Kern mit der $^3\text{HTdR}$ -Konzentration nach Pulsmarkierung (15 min Inkubation; 24 h Exposition).

Die mittlere Silberkornzahl pro Kern einer zufällig ausgewählten Anzahl von Zellen der S-Phase einer asynchronen Population gibt ein Maß für die spezifische Aktivität der DNS, die durch das eingebaute markierte Thymidin innerhalb einer bestimmten Zeit entstanden ist. Je größer die pro Zeiteinheit eingebaute $^3\text{HTdR}$ -Menge ist, umso höher ist bei gleicher Expositionszeit die Silberkornzahl über den DNS-synthetisierenden Zellen.

Autoradiographische und zytophotometrische Untersuchungen von individuellen Zellen (Hale u.a. 1965) zeigten die direkte Korrelation zwischen Silberkornzahl, d. h. der spezifischen Aktivität der DNS nach der Markierung und DNS-Menge. Dies gilt für alle Pyrimidinnukleotide in gleicher Weise. Man kann folglich bei konstanter Poolgröße aus der Zunahme der Silberkornzahl pro Stunde bei Dauerangebot von $^3\text{HTdR}$ Rückschlüsse auf die mittlere DNS-Synthesegeschwindigkeit ziehen. Die DNS-Synthesegeschwindigkeit der einzelnen Zellen, insbesondere zu den verschiedenen Zeiten innerhalb der S-Phase, kann dabei durchaus verschieden sein.

Im Idealfall würde die mittlere Silberkornzahl pro Kern nach Pulsmarkierung genügen, um über die relative Einbaugeschwindigkeit Aussagen machen zu können. Doch wird diese Silberkornzahl durch Fehlerquellen wie z. B. ungleiche Expositionsbedingungen (Feuchtigkeitsgrad) variieren, so daß die Werte untereinander nicht ohne weiteres verglichen werden können. So kann selbst unter strengem Ausschluß von Sauerstoff und Wasser (Haase, pers. Mittlg.) sowie bei 4°C der Effekt des "image fading" nicht ganz vermieden werden. Das heißt, das latente Bild auf dem Film verblagt während der Expositionszeit durch Oxydation oder Verlagerung der Silberatome im Silberbromidkorn. Abb. 5 zeigt, daß schon nach 4 Tagen die Steigung der Silberkornzahl mit der Dauer der Expositionszeit geringer wird.

Das Plateau ist erreicht, wenn die Bildinduktion mit dem Verblassen des latenten Bildes im Gleichgewicht steht (Rogers 1967). Die langen Expositionszeiten der Präparate der hypoxischen Kulturen verursachen somit zu niedrige Silberkornzahlen pro Kern, verglichen mit den Silberkornzahlen der weniger lang exponierten Präparate der auf die gleiche Expositionsdauer korrigierten Kontrollen.

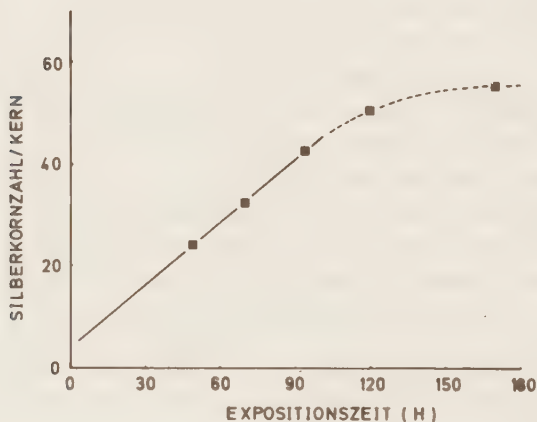


Abb. 5 Zunahme der mittleren Silberkornzahl pro Kern mit der Expositionszeit. Nach rd. 100 h biegt die Anstiegsgerade in ein Plateau ab (0,01 μ Ci/ml 3 HTdR; 15 min Inkubation).

Um die relative Einbaugeschwindigkeit der S-Phasezellen festzustellen, wird daher die mittlere Silberkornzahl zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe der 3 HTdR-Aktivität gemessen und die Steigung der durch die gewonnenen Punkte gelegten Geraden bestimmt. Da alle Präparate eines Versuches den gleichen Expositionsbedingungen unterworfen sind, ist die Steigung der Silberkorndichte somit unabhängig von der Expositionsdauer.

Bei permanenten Zellstämmen in vitro wird die DNS-Vorstufe Thymidin nicht wie im Versuchstier schon in der ersten halben Stunde soweit abgebaut, daß eine einmalige Gabe wie eine Pulsmarkierung verläuft. Vielmehr kann die Aktivität von den Zellen ständig weiter aufgenommen werden, da $^3\text{HTdR}$ bzw. TdR nur unvollständig und anfangs sehr langsam in Thymidin usw. umgewandelt wird, wie Lang u.a. (1966) an Hela-Zellen zeigten. In den ersten 3 h etwa wird die Aktivität in einer konstanten Rate eingebaut, später nimmt sie immer mehr ab (Cleaver und Holford 1965, Lang u.a. 1966). Wie die im Ergebnisteil beschriebenen Versuche zeigen, ist der Einbau der Aktivität bei chin. Hamsterzellen über einen Zeitraum von 3 h konstant, wobei die beobachteten Schwankungen der mittleren Silberkornzahl pro Kern zellkinetische und statistische Gründe haben.

Veränderungen des $^3\text{HTdR}$ -Pools (Dörmer u.a. 1968) oder der DNS-Synthesegeschwindigkeit zu verschiedenen Zeitpunkten der S-Phase (Lederer und Kiefer 1968, Dörmer u.a. 1970) wirken sich, wie schon erwähnt, nicht auf die mittlere Silberkornzahl pro Kern aus, da zur Bestimmung dieses Mittelwertes in einer asynchronen Population S-Phasezellen aller Stadien verwendet werden.

4.2212 Einfluß der Zellprogression im Zyklus auf die Silberkorndichte

Bei der Ermittlung der Einbaurate nach Dauermarkierung muß berücksichtigt werden, daß während des Versuches ein ständiger Einstrom von Zellen in die S-Phase und Zellfluß aus der S-Phase stattfindet. Beide Vorgänge tragen dazu bei, die mittlere Silberkorndichte pro Kern zu vermindern. Bei der Auswertung der Präparate werden nämlich wahllos 100 markierte Zellkerne ausgezählt. Um eine unverfälschte Zunahme der in die Zelle im Laufe der S-Phase eingebauten Aktivitäten mit der Inkubationsdauer zu erhalten, dürfen nur diejenigen Zellen zur Berechnung

der mittleren Silberkornzahl verwendet werden, die sich im Verlaufe des gesamten Versuches in der S-Phase befunden haben. Wenn eine halbe Stunde nach Markierungsbeginn eine Stichprobe von 100 markierten Zellen ausgewertet wird, so kann man annehmen, daß es sich zunächst um reine S-Phasenzellen handelt. In einer weiteren halben Stunde besteht ein Teil der markierten Zellen aus solchen, die frisch in die S-Phase eingewandert sind und ein Teil aus solchen, die schon markiert sind, aber aus der S-Phase ausgewandert sind. Die Zahl der markierten Zellen nimmt also jede halbe Stunde um diejenigen Zellen zu, die neu in die S-Phase einwandern, nicht jedoch um diejenigen, die aus ihr auswandern. Das heißt, daß von den hundert Zellen der Stichprobe nach jeder weiteren halben Stunde pro halbe Stunde

$$2 \times \frac{100}{2 T_S + 1}$$

abgezogen werden müssen:

$\frac{100}{2 T_S}$ ist diejenige Zellzahl, die nach der ersten halben

Stunde, d. h. zu Versuchsbeginn, pro Zeitabschnitt zu erwarten ist ($2 T_S$ = Dauer der S-Phase in halben Stunden). Nach einer weiteren halben Stunde verringert sich die Zellzahl auf

$\frac{100}{2 T_S + 1}$ usw. bis $\frac{100}{2 T_S + n}$. Hier entspricht $n = 0$ den

Bedingungen nach der ersten halben Stunde, die einer Pulsmarkierung gleichkommt. Bei der nächsten halben Stunde ist $n = 1$ usw. Während pro Zeitabschnitt sich im Verlauf des Versuches die Zellzahl verringert, erhöht sich die Zahl der abzuziehenden

Kerne um $\frac{100 n}{2 T_S + n}$. Jede halbe Stunde müssen 2 solcher

"Zeitabschnitte" d. h. die darin erwarteten Kernzahlen von den 100 Zellen der Stichprobe abgezogen werden, da nur solche Zellen verwendet werden sollen, die sich während des gesamten

Versuches ständig in der S-Phase befunden haben. Es werden folglich

$$100 = \frac{2 n \times 100}{2 T_S + n}$$

Zellen ausgewertet. Um die mittlere Silberkorndichte D der restlichen Kerne zum Zeitpunkt n zu erhalten, muß von der Gesamtsumme der Silberkörner der 100 ausgewerteten Kerne $Z_{(G,n)}$ die Summe der Silberkörner über $\frac{2 n \times 100}{2 T_S + n}$ Kernen abgezogen werden. Die Silberkorndichte der einzelnen abziehenden Kerne muß dabei $= D_{n-1}$ sein.

$$D_n = \frac{Z_{(G,n)} - \sum_{K \in B'} p(K)}{100 - |B'|}$$

$p(K)$ bedeutet die Zahl der Silberkörner pro Kern K ,

K ist die Variable für Kerne,

B ist die Zahl der Kerne K mit der Silberkorndichte $p(K) = D_{n-1}$;

B' entspricht der Zahl der abzuziehenden Kerne, d. h.

$$\frac{2 n \times 100}{2 T_S + n}.$$

$|B'|$ besagt, daß, falls nicht so viele Kerne mit der Silberkorndichte D_{n-1} vorhanden sind, auch Kerne mit der Silberkorndichte D_n abgezogen werden können.

Die obigen Überlegungen gehen von der Voraussetzung aus, daß gleich viele Zellen pro Zeiteinheit in die S-Phase ein- und aus der S-Phase austreten. In einer exponentiell wachsenden Zellkultur treten jedoch wegen der abfallenden Altersverteilung mehr Zellen pro Zeiteinheit ein als aus. Bei einer Aufteilung der S-Phase in gleichwertige Einzelabschnitte wird diese Altersverteilung nivelliert, denn die Zahl der Kerne pro Abschnitt ist zu dem jeweiligen Zeitpunkt gleich groß. Diejenigen Zellen, die am Ende der S-Phase noch markiert wurden und durch die G_2 -Phase gewandert sind, teilen sich und verdünnen damit

weiterhin die mittlere Silberkorndichte. Weist die Verteilung der G_2 -Phasenlänge (vgl. S. 71) geringe Streuung auf, tritt eine vorübergehende Verzögerung in dem Anstieg der Silberkorndichte mit der Inkubationsdauer in $^3\text{HTdR}$ ein. Dadurch, daß bei der Korrektur der bestimmten Silberkornzahlen nach obiger Methode stets nur die Kerne mit den niedrigsten Silberkornzahlen abgezogen wurden, wurde der erhaltene Wert immer etwas angehoben. Insgesamt gesehen ist die oben angeführte Berechnung der mittleren Silberkornzahl eine einfache und ausreichende Annäherung an die vorliegenden Verhältnisse.

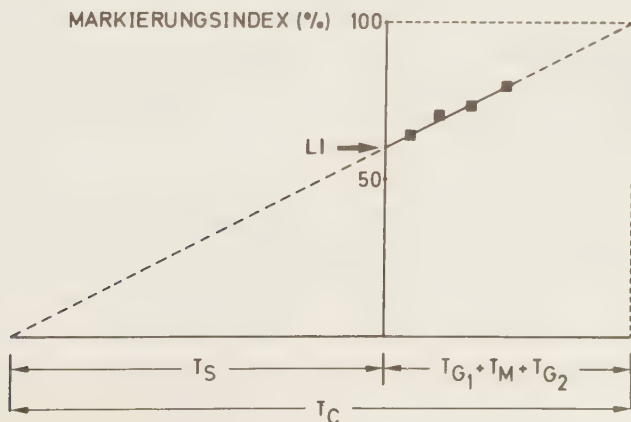
4.222 Bestimmung der Zellzyklusphasen mit Hilfe des Anstiegs des Markierungsindex bei Dauermarkierung

Bei Dauermarkierung steigt der Markierungsindex einer Zellkultur an, da ständig Zellen aus der G_1 - in die S-Phase einströmen. Die Anstiegsgeschwindigkeit des Markierungsindex ist abhängig von der Generationszeit. Im Experiment genügen wenige Stunden Dauermarkierung, um die Steigung der Kurve des Markierungsindex zu erhalten. Diese kurze Zeit ist zweckmäßig, da bei längeren Versuchszeiten möglicherweise Veränderungen der Flußraten eintreten, so daß die Zahl der in die S-Phase einströmenden Zellen und der aus der S-Phase ausströmenden Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten verschieden ist. In einer exponentiell wachsenden Zellkultur ist durch die charakteristische Altersverteilung (vgl. Schema 2) der Einstrom von G_1 -Phasezellen in die S-Phase größer als der Einstrom der S-Phasezellen in die G_2 -Phase. Gleichzeitig wird jedoch der Pool der noch unmarkierten Zellen durch die Teilung der unmarkierten G_2 -Phasezellen vergrößert. Komplizierend kommt später noch die Teilung der bereits markierten Zellen hinzu. Ungeachtet der verschiedenen Faktoren erhält man einen etwa linearen Anstieg des Markierungsindex bei Dauermarkierung. Mit Hilfe des Markierungsindex bei Pulsmarkierung zu

den verschiedenen Versuchszeitpunkten wurde geprüft, ob der Anteil der Zellen an der S-Phase konstant blieb.

Die Dauer der S-Phase kann bestimmt werden unter Verwendung des Pulsmarkierungsindex und des Anstiegs des Markierungsindex pro Zeiteinheit bei Dauermarkierung. Die Zeit, in der doppelt so viele Zellen markiert sind wie zu Beginn des Versuches, entspricht der Dauer der S-Phase. Man berechnet sie, indem man den Pulsmarkierungsindex durch die Steigung dividiert. Die Population ist zu 100 % markiert, wenn alle G_1 -, G_2 - und M-Phasezellen, die zu Versuchsbeginn noch unmarkiert waren, die S-Phase erreicht haben. In Schema 4 ist die Anstiegsgerade nicht nur bis zum 100 %-Wert durchgezogen, sondern auch nach links auf die Abszisse, die Zeitachse, verlängert. So wird deutlich, daß die Generationszeit dem Zeitraum zwischen 0 - 100 % markierter Zellen und die S-Phasendauer dem Zeitraum zwischen 0 - LI (Markierungsindex nach Pulsmarkierung) entspricht. Der Abszissenabschnitt, der unter dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate (=LI) und dem 100 %-Wert liegt, entspricht der Dauer der G_1 -, G_2 - und M-Phasen zusammen. Bei bekannter G_2 - und M-Phasendauer läßt sich daraus die G_1 -Phasenlänge berechnen (Defendi und Manson 1963, Kollmorgen u.a. 1967, Baserga und Wiebel 1969).

Schema 4 Anstieg des Markierungsindex bei Dauermarkierung



4.3 Technische Einzelheiten zu den Markierungsversuchen

4.31 Herstellung und Auswertung der Autoradiogramme

Die Zellen wurden auf ganzen oder längs-halbierten Objektträgern, die sich in Petrischalen befinden, gezüchtet. 24 h nach der Aussaat von 100 000 - 150 000 Zellen wurden die Objektträger, auf denen sich ein dünner Zellrasen ausgebreitet hatte, aus den Petrischalen herausgenommen und in neue Petrischalen oder Vierkantflaschen übertragen. Durch die Übertragung wurde erreicht, daß sich nur auf den Objektträgern Zellen befinden und nicht auch auf dem Boden der Kulturgefäße. Es wurden jeweils 8 ml altes und 2 ml frisches Medium auf die übertragenen Objektträger gegeben. Das Medium wird so bei einem längeren Versuch langsamer verbraucht, der pH-Wert bleibt längere Zeit konstant und der Spülvorgang nach der Markierung wird dadurch erleichtert. Nach 48 h wurde mit dem Versuch begonnen. Zur Markierung wurde $^3\text{HTdR}$ der spezifischen Aktivität 2 Ci/mM in Endkonzentrationen zwischen 0,005 bis 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$ verwendet.

Die Stammlösung bestand aus Medium ohne Serum mit einer $^3\text{HTdR}$ -Konzentration von 10 $\mu\text{Ci/ml}$. Bei den meisten Versuchen wurden 0,5 ml der bis zur gewünschten Konzentration verdünnten Aktivität entweder in die Petrischale pipettiert (Kontrollen) oder mit einer Plastikspritze durch ein kleines Loch in die Vierkantflasche gespritzt (hypoxische Kulturen). Die Kanüle wurde durch den das Loch verschließenden Silikonstopfen durchgestochen.

Zur Präparation wurden die Objektträger aus den Kulturgefäßen herausgenommen und 3mal in Hank's Salzlösung je 3 - 5 min lang gewaschen. Dann wurden die Präparate für 1 - 5 min in hypotone Natriumzitratlösung (0,8 %ig)

bei 37° C gestellt, abgetropft und in eine Petrischale gelegt. In die halbgeschlossene Petrischale wurden langsam ca. 14 ml Fixativlösung (Alkohol : Eisessig = 3 : 1) zugegeben. Nach 20 min wurden die Präparate luftgetrocknet.

Zur Autoradiographie wurde die Eastman Kodak NTB 2 Filmemulsion verwendet, die empfindlich ist gegenüber den β -Partikeln des Tritium, aber eine sehr geringe Hintergrundschwärzung aufweist. Die Arbeiten wurden bei dunkelstem Rotlicht durchgeführt. Die Emulsion wurde 1 : 1 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Präparate wurden in die dünnflüssige Filmemulsion gehalten, zum Abtropfen für wenige Sekunden aufgestellt und dann waagrecht hingelegt. Nach 20 min Trocknungszeit wurden die Präparate in den Kühlschrank der Dunkelkammer gebracht und bei 4° C und trockener Atmosphäre je nach Bedarf 1 - 14 Tage absolut lichtdicht exponiert. Nach Ablauf der jeweiligen Expositionszeit wurden die Autoradiogramme in Kodak D-19b Entwicklerlösung 5 - 8 min lang - je nachdem, welche Silberkorngröße gewünscht war - entwickelt, in 3 %iger Essigsäure gespült und 8 min in Kodak UNIFIX fixiert. Zum Schluß wurden sie 30 min lang in langsam fließendem Wasser gespült. Die Autoradiogramme wurden luftgetrocknet und dann in einer frisch angesetzten 2 %igen gefilterten Giemsalösung für ca. 10 min angefärbt.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme wurden zur Bestimmung des Markierungsindex 2000 Zellen pro Präparat ausgezählt. Diese Präparate wurden ebenso wie diejenigen zur Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen nicht mit einem Deckglas versehen. Die Haltbarkeit der Präparate ist dadurch nicht merklich beeinträchtigt. Nur zur Silberkornzählung oder zur Chromosomenanalyse wurden die Präparate eingedeckt (Ölimmersion).

Die Silberkornzählung wurde jeweils an 100 Zellen eines

Autoradiogrammes durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen nach dem Zufall ausgewertet wurden; so wurden alle Zellen verwendet, die beim Durchschieben des Präparates am Mikroskop in einer Richtung ins Gesichtsfeld kamen.

4.32 Kontrollen

4.321 Pulsmarkierung

Zur Bestimmung des Markierungsindex nach Pulsmarkierung wurden die Zellen in einer aktiven Lösung von 0,5 - 0,25 μCi $^3\text{HTdR/ml}$ in der Endkonzentration inkubiert. Nach 30 min wurden die Objektträger entnommen und für die Autoradiographie vorbereitet.

Bei der Pulsmarkierung der Zellen zur Bestimmung der Kurve der markierten Mitosen wurden die Zellen nach der Markierung weitergezüchtet. Es erwies sich als günstig, die Markierung nicht in Petrischalen mit anschließendem Mediumwechsel vorzunehmen, sondern extern. Die Objektträger mit dem angewachsenen Zellrasen wurden daher in eine Stehküvette mit 100 ml Vollmedium und 0,1 μCi $^3\text{HTdR/ml}$ übertragen. Das Medium hatte eine konstante Temperatur von 37°C . Alle Objektträger wurden etwa gleichzeitig markiert. Nach 20 min Inkubation in der Aktivität wurden die Objektträger in eine weitere Stehküvette mit Vollmedium, das einen Zusatz von 20 μg unmarkierten TdR/ml enthält, gebracht. Die Objektträger wurden nach 5 min herausgenommen und auf gleiche Weise noch einmal gespült. Die 2. Waschlösung enthielt nur noch 10 μg TdR/ml. Danach wurden die Objektträger in die ursprünglichen Petrischalen zurückgelegt und bei 37°C weiter im Brutschrank inkubiert. In bestimmten Zeitintervallen wurden die Objektträger aus diesen Petrischalen entnommen und zu Präparaten für die Autoradiographie verarbeitet.

4.322 Dauermarkierung

Zur Bestimmung der $^3\text{HTdR}$ -Einbauraten wurden die Zellen 48 h nach Neuaussaat in einer $^3\text{HTdR}$ -Konzentration von 0,005 oder 0,01 $\mu\text{Ci/ml}$ inkubiert. Es wurde diese niedrige Konzentration gewählt, um die Silberkorndichte über den Zellkernen in den Autoradiogrammen niedrig, d. h. zählbar zu halten. Nach Beginn der Dauermarkierung wurden während eines Zeitraumes von 3 h alle 1/4 oder 1/2 Stunde Objektträger entnommen und zu Präparaten für die Autoradiographie verarbeitet. Es wurde 2 - 5 Tage lang exponiert. Die Expositionszeit bestimmt ebenfalls die Silberkorndichte, die nicht zu groß sein darf, um die richtige Auszählung auch der am stärksten markierten Zellen zu ermöglichen.

Bei der Bestimmung der Zunahme des Markierungsindex nach Dauermarkierung wurden die Zellen in einer $^3\text{HTdR}$ -Konzentration von 0,1 oder 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$ inkubiert. Auch hier wurden während eines Zeitraumes von ca. 3 h alle halbe Stunde Präparate entnommen und zur Autoradiographie vorbereitet. Die Expositionszeit betrug 3 - 4 Tage.

4.33 Hypoxische Kulturen

Ca. 150 000 Zellen wurden in Petrischalen mit je 2 halben Objektträgern ausgesät. Nach 24 h wurden die Objektträger in Vierkantflaschen umgesetzt und nach 48 h an die Begasungsanlage angeschlossen. Die radioaktive Lösung wurde jedesmal vor der Verwendung mit N_2 -Gas durchperlt.

4.331 Pulsmarkierung

Zur Bestimmung des Markierungsindex nach Pulsmarkierung wurden die Zellen mit 0,5 oder 0,25 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{HTdR}$ in Zeitintervallen von 2 - 3 h markiert. Anschließend wurden die Objektträger zu Präparaten für die Autoradiographie vorbereitet. Der Markierungsindex nach Pulsmarkierung wurde während eines Zeitraumes von 48 h nach Beginn der Hypoxie bestimmt.

Bei den Versuchen zur Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen wurden die Zellen nach 14 h chronischer Hypoxie mit einer Konzentration von 0,25 μCi $^3\text{HTdR/ml}$ in der Endkonzentration markiert. Nach 30 min Inkubation wurde mit Hilfe einer Öldruckpumpe durch eine kleine Öffnung der Kulturflasche das aktive Medium abgesaugt und mittels einer Cornwallspritze 5 ml frisches Medium (soweit möglich O_2 -frei und bei 37°C) mit einem Zusatz von 10 μg unmarkierter TdR pro ml aufgefüllt. Diese Spüllösung wurde nach 10 min wieder abgesaugt und durch 10 ml hypoxisches Vollmedium (10 μg TdR/ml) ersetzt. Darin wurden die Zellen bis Versuchsende inkubiert. Die Entnahme der halben Objektträger erfolgte in Zeitintervallen von 2 - 3 h. Bei diesen Versuchen stand noch kein Wärmerraum zur Verfügung, daher wurde bei geöffnetem Brutschrank gearbeitet, so daß eine leichte Abkühlung der Zellen während der Manipulation stattfand. Zusätzlich konnten Spuren von O_2 während des Mediumwechsels eindringen und den Hypoxiegrad verringern. Aufgrund der Ergebnisse war es jedoch nicht erforderlich, die Versuche unter verbesserten Bedingungen zu wiederholen.

4.332 Dauermarkierung

Die $^3\text{HTdR}$ -Einbauraten nach 14 h Hypoxie wurde wie bei den Kontrollkulturen durch Entnahme von Präparaten in halbstündlichen Intervallen nach Beginn der Dauermarkierung bestimmt. Statt $0,005 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR/ml}$ wurden jedoch stets $0,01 \mu\text{Ci/ml}$ in der Endkonzentration verwendet. Bei einer Konzentration von $0,005 \mu\text{Ci/ml}$ mußte über 14 Tage lang exponiert werden, um eine Mindestanzahl von Silberkörnern pro Kern in den Autoradiogrammen zu erhalten. Da die Expositionszeiten nicht zu weit auseinander liegen sollten und es sich erwiesen hat, daß sich in diesem Bereich die Silberkornzahl bei verdoppelter Aktivität ebenfalls verdoppelt, konnte bei den hypoxischen Zellkulturen mit erhöhter $^3\text{HTdR}$ -Konzentration gearbeitet werden. Die Expositionszeit betrug 8 - 9 Tage. Die Normierung der Daten und die Berechnung der S-Phasendauer wurde oben (II/4.221) schon besprochen.

Auch die Zunahme des Markierungsindex nach Dauermarkierung wurde nach 14 stündiger Hypoxie gemessen. Wie bei den Kontrollen wurde eine $^3\text{HTdR}$ -Konzentration von $0,25 \mu\text{Ci/ml}$ verwendet. Die Probenentnahme erfolgte hier jedoch alle 1 - 3 h über einen Zeitraum von 24 h.

4.4 Mitoseindex und Mitosedauer

4.41 Allgemeines

Der Mitoseindex gibt den prozentualen Anteil der sich teilenden Zellen an der Zellpopulation an. Er wird u. a. zur Berechnung der Mitosedauer und der Generationszeit benötigt. Die Mitose nimmt den geringsten zeitlichen Anteil am gesamten Zellzyklus ein. Veränderungen ihrer

Dauer, die Schwankungen ihrer Häufigkeit in der Population zur Folge haben, sind daher nicht leicht festzustellen.

Mit Hilfe des Mitoseindex (MI) und der Generationszeit (T_C) läßt sich die Dauer der Mitose bestimmen: $T_M = MI \times T_C / 100$ (h). Bei Zellarten des chin. Hamsters beträgt die durchschnittliche Mitose-Dauer 0,6 - 1,0 h (Baserga und Wiebel 1968). Gefunden werden jedoch meist geringere Werte. Denn bei einer exponentiell wachsenden Zellkultur muß wegen der nicht linearen Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Zellzyklus (vgl. Schema 2) ein Korrekturfaktor $\ln 2$ eingeführt werden:

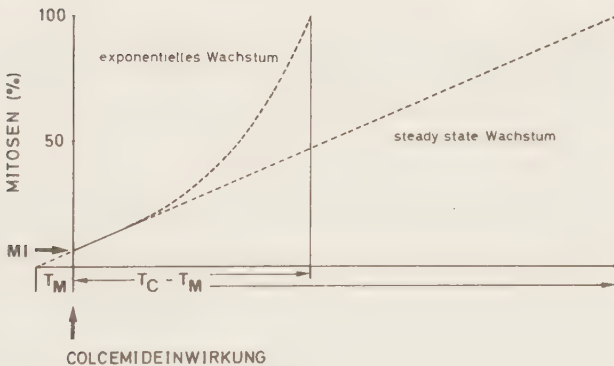
$$T_M = MI \times T_C / \ln 2 \times 100 \text{ (h)}$$

Unter besonderen Bedingungen kann der Mitoseindex der Zellkultur so weit absinken, daß seine genaue Bestimmung schwierig wird. Auch bei unbekannter Dauer der Generationszeit wird zur Untersuchung der Mitosedauer eine besondere Methode verwendet. Durch Arretierung der Zellen in der Mitose mit dem Spindelgift Colcemid kann man eine Anreicherung der Zellen in der Metaphase erreichen. Nach Ablauf einer Zyklusdauer sind theoretisch alle Zellen in der Mitose angelangt, der Mitoseindex beträgt 100 %. Aus dem Anstieg des Mitoseindex pro Zeiteinheit lassen sich Rückschlüsse auf die Generationszeit und die Mitosedauer ziehen. Je geringer die Steigung der erhaltenen Gerade ist, umso langsamer wandern die G_2 -Phasezellen in die Mitose. Da es sich um eine asynchrone Zellpopulation handelt, ist die Flußrate der G_2 -Phasezellen in die Mitose von der Dauer der Generationszeit abhängig. Verlängert man die Anstiegsgerade bis zum 100 %-Wert, so entspricht bei einer Zellpopulation des steady-state-Wachstums der Abschnitt auf der Abszisse der Dauer der Generationszeit abzüglich der Dauer der Mitose (vgl. Schema 5). Die Mitose-

dauer erhält man, indem man die Gerade nach links auf die Abszisse verlängert. Sie ist also wie die Generationszeit bestimmbar mit Hilfe der Steigung des Mitoseindex nach Colcemidgabe und des Mitoseindex zu Versuchsbeginn.

Schema 5

Anstieg des Mitoseindex nach Colcemideinwirkung auf eine Zellpopulation in exponentiellem Wachstum und im Fließgleichgewicht (steady-state-Wachstum)



Der Anstieg des Mitoseindex ist nur bei einer Zellkultur des steady-state-Wachstums linear. Bei einer sich exponentiell vermehrenden asynchronen Zellkultur, deren Zellzunahme nach der Colcemideinwirkung stoppt, folgt der Anstieg einer Exponentialfunktion. Der Einstrom der Zellen in die Mitose ist also, wie aus der charakteristischen Altersverteilung der Zellen hervorgeht (vgl. Schema 2b), am Anfang des Versuches geringer als am Ende, wenn der 100 %-Wert erreicht wird (obere Kurve in Schema 5).

Da in der vorliegenden Arbeit der Anstieg des Mitoseindex nur während der ersten Stunden gemessen wurde, ist er dem linearen Anstieg des Mitoseindex einer steady-state-Population vergleichbar (durchgezogener Kurvenabschnitt des Schema 5). Die Verlängerung dieser fiktiven Geraden auf die Abszisse grenzt genau die Dauer der Mitose ab. Zur Berechnung der Mitosedauer (T_M) wird diese lineare Beziehung zwischen der Mitosedauer und der anfänglichen Zunahme des Mitoseindex (MI) pro Stunde (Steigung) verwendet:

$$T_M = \text{MI/Steigung (h)}$$

Bei unbekanntem Mitoseindex zu Versuchsbeginn kann mit Vorbehalt die graphische Methode zur Bestimmung der Mitosedauer verwendet werden.

Die Dauer der Generationszeit läßt sich ebenfalls mit Hilfe der Steigung des Mitoseindex nach Colcemideinwirkung bestimmen. Da jedoch in einer exponentiell wachsenden Zellkultur der 100 %-Wert des Mitoseindex bei gleicher Anfangssteigung eher erreicht wird als bei einer steady-state-Population, muß bei der Berechnung die Generationszeit (T_C) mit dem Faktor $\ln 2$ korrigiert werden:

$$T_C = \frac{100 \times \ln 2}{\text{Steigung}} \quad (\text{h})$$

Gleiches gilt für die graphische Bestimmung der Generationszeit.

4.42 Bestimmung des Mitoseindex der Kontrollen und der hypoxischen Kulturen

Zur Bestimmung des Mitoseindex unter Normalbedingungen wurden ca. 150 000 Zellen in Petrischalen mit ganzen Objektträgern ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen mit einer gepufferten Salzlösung (Hank's) überschichtet und nach 5 min vorsichtig fixiert. Nach Ablauf von 15 min wurden die Präparate luftgetrocknet, in Giemsa-Lösung angefärbt und ausgewertet. Pro Präparat wurden 2000 Zellen ausgewertet.

Eine andere Methode zur Bestimmung des Mitoseindex bestand darin, die Zellen abzulösen und die aufbereitete Zellsuspension auf den Objektträger aufzutropfen. Die Zellen wurden in diesem Fall nach 48 h abtrysiniert und bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Zellrückstand wurde darauf in Hank's Salzlösung gewaschen, in hypotoner Natriumcitratlösung (0,8 %) wieder aufgeschwemmt und 5 min bei 37°C stengelassen. Nach Abzentrifugation wurden die Zellen mit Fixativ überschichtet und 2 h lang inkubiert. Anschließend wurde durchpipettiert, abzentrifugiert und in wenig Fixativ suspendiert, das dann auf die Objektträger aufgetropft wurde. Die anschließend luftgetrockneten Präparate konnten sofort gefärbt und ausgewertet werden.

Die Hemmung des Zellzyklus in der Metaphase der Mitose wurde mit dem Spindelgift Colcemid durchgeführt. Das Colcemid wurde in einer Konzentration von 0,08 oder 0,168 μ g pro ml in der Endkonzentration gleichzeitig in alle Kulturgefäße gegeben, die dann weiter im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden

alle 15 - 20 min Präparate hergestellt. Es wurden dabei die beiden beschriebenen Methoden verwendet.

Bei der Bestimmung des Mitoseindex der hypoxischen Zellkultur nach 14 stündiger Hypoxie vor und nach Colcemidabgabe wurde anfänglich verfahren wie bei den Kontrollkulturen. Nur wurde das Colcemid vor der Verwendung mehrere Stunden mit Stickstoff durchgespült, um den Sauerstoff zu verdrängen. Die Zugabe des Hemmstoffes erfolgte durch eine kleine Öffnung der Kulturflasche mittels einer Spritze. Da die hypoxische Zellkultur einen sehr niedrigen Mitoseindex besitzt, wurden pro Präparat 4000 Zellen ausgewertet.

4.5 Impulszytrophotometer

4.51 Allgemeines

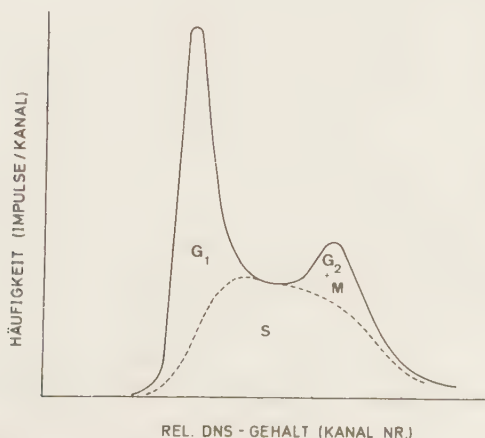
Mit Hilfe des Fluoreszenz-Durchflußphotometers (Dittrich und Göhde 1969) kann die Häufigkeitsverteilung des DNS-Gehaltes pro Zelle einer Zellpopulation schnell gemessen werden. Bis zu 1000 Zellen können dabei pro Sekunde in der Durchflußkammer zur Fluoreszenz angeregt, gemessen und im Vielkanalanalysator klassifiziert werden. Das ausgedruckte Histogramm zeigt auf der Abszisse die Intensität des Impulses, d.h. die DNS-Menge pro Zelle, nach rechts hin steigend und auf der Ordinate die Anzahl der Impulse bzw. Zellen mit ihrem verschiedenen DNS-Gehalt an. Die Histogramme werden auf die relativen Anteile der verschiedenen Zellphasen am Zyklus untersucht. Mit Hilfe der mittleren Zyklusphasezeiten der Kontrollpopulation wird unter Berücksichtigung des exponentiellen Wachstums der Zellen (Bestimmung der Flächeninhalte unter der Altersverteilung, vgl. Schema 2b) die prozentuale Verteilung der Zellen auf die

einzelnen Zyklusphasen berechnet. Das Histogramm, d.h. die Verteilung der Häufigkeit der verschiedenen DNS - Mengen pro Zelle einer Zellpopulation, läßt sich ebenfalls in prozentuale Anteile der Zellen an den einzelnen Zyklusphasen aufteilen. Hier ist der Übergang der DNS - Menge der Zellen der G_1 - zu den Zellen der S-Phase jedoch fließend, ebenso wie bei den Zellen der S- und G_2 -Phase. Die Zellen der Mitose und der G_2 -Phase lassen sich aufgrund ihres DNS-Gehaltes nicht unterscheiden und erscheinen deshalb in demselben Gipfel.

Die G_1 -Phasezellen mit dem einfachen DNS-Gehalt bauen den linken Gipfel des Histogrammes auf. Wie Schema 6 zeigt, reicht die DNS-Verteilung der S-Phasezellen weit in diejenige der G_1 -Phasezellen und der G_1+M - Phasezellen hinein. Wegen des exponentiellen Wachstums der Population ist die Verteilung der S-Phasezellen rechtsschief. Ist der prozentuale Anteil der Zellen an den Zyklusphasen aus anderen Versuchen bekannt, so kann der etwas ungewisse Verlauf der Verteilung der S-Phasezellen daran angepaßt werden.

Schema 6:

Verteilung der Zellen auf den Zellzyklus, gemessen an ihrem DNS-Gehalt.



4.52 Technische Einzelheiten zur Methode

Rund 150 000 Zellen wurden in Vierkantflaschen eingesät. Nach 48 h wurden die Kulturen mit dem wasserdampfgesättigten $N_2 + CO_2$ -Gasgemisch begast. Zur Messung des DNS-Gehaltes der Zellen im Impulszytrophotometer wurden die Zellen der Kontrollen sofort und die begasten Zellen etwa alle 3 Stunden nach Beginn der Hypoxie trypsiniert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (200 g für 5 min) und 2 x mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Rund 10^6 bis 10^8 Zellen wurden dann durch langsames Eintropfen in 20 ml absoluten Alkohol fixiert. Zur Vermeidung von Zellverklumpungen wurde die Probe geschüttelt. Nach 20 min wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Alkohol getrennt und wieder mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension und einstündige Inkubation der Zellen in 10 ml einer 0,1 %igen RNase-Lösung (50 E/mg, DNase-frei) bei 37°C im Wasserbad. Nach erneuter Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zellen in 10 ml einer 0,001 %igen gepufferten Ethidiumbromidlösung gefärbt. Frühestens 20 min nach der Fluorochromierung wurde der DNS-Gehalt der Zellen im Impulszytrophotometer der Phywe AG (Göttingen) gemessen.

III. Ergebnisse

1. Morphologische und zytogenetische Beobachtungen

Unter guten Wachstumsbedingungen und während ihrer exponentiellen Wachstumsphase sehen die chin. Hamsterzellen nur noch vereinzelt spindelförmig aus. Meist strecken die Zellen nach verschiedenen Richtungen kurze Plasmafortsätze aus, die sich mit denen der Nachbarzelle nicht überschneiden. Der Nukleus ist wenig granuliert. Im Plasma ist stets ein großer Fettropfen zu finden. Es treten kaum Riesenzellen oder mehrkernige Zellen auf.

Nach 14 stündiger Hypoxie ist der große Fettropfen verschwunden und das Plasma erscheint rund um den Zellkern stark granuliert. Die Zellen sehen im Präparat größer als gewöhnlich und abgerundet aus, als wären sie mit hypotoner Lösung behandelt.

Besonders auffällig verändern sich die mitotischen Zellen (vgl. Abb. 6):

Die Chromosomen sind dick und liegen getrennt voneinander in der Zelle. Mitunter sind sie so stark kondensiert, wie man es sonst nach längerer Einwirkung des Spindelfasergiftes Colcemid beobachten kann. In der Tat scheint die Ausbildung der Spindel gestört zu sein, denn es treten immer wieder multipolare Mitosen auf, die zu vielkernigen Zellen führen. Meist liegen die Chromosomen ungeordnet oder in unnatürlichen Gruppen verstreut in der Zelle. Eine normale Zellteilung findet seltener statt. Häufig sieht man kleine pyknotische Kerne dicht nebeneinander, die offensichtlich von einer gescheiterten Mitose stammen; diese Zelle stirbt somit an der Mitose. Riesenzellen mit deformierten Kernen treten häufiger auf. Nach 48 h Hypoxie lösen sich ganze Zellverbände vom Glasboden, wobei sich die Zellen vorher meist nicht mehr abrunden, d.h. Interphasezellen gehen zugrunde.

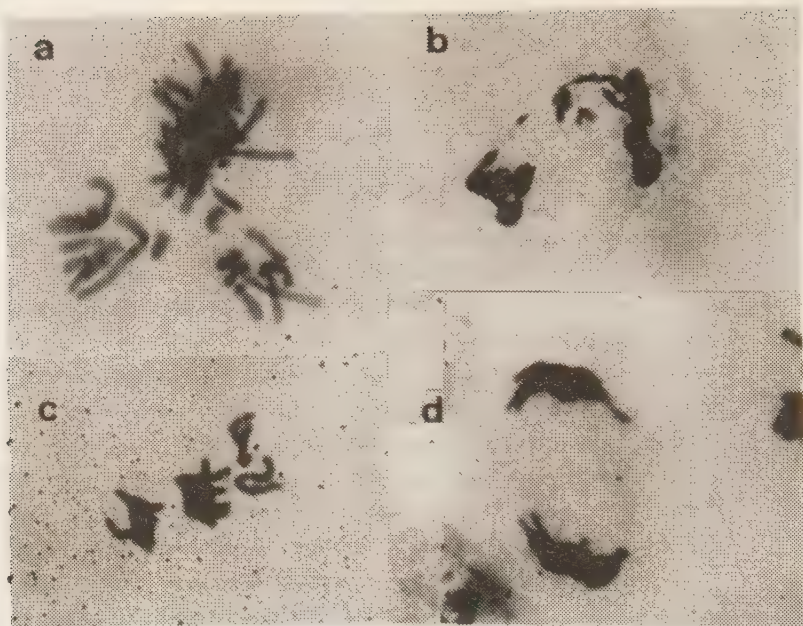


Abb. 6

a - c) Mitosen chronisch hypoxischer Zellen,
d) Mitose unbehandelter Zellen (x 400).

Nach 72 h chronischer Hypoxie sind die meisten Zellen abgelöst, die restlichen sehen im Präparat nicht mehr gequollen, wohl aber noch granuliert aus. Die Zellen nehmen in diesem Stadium nur noch vereinzelt $^3\text{HTdR}$ auf.

Abb. 3 (vgl. S. 6) zeigt, daß sich nach 15 stündiger Hypoxie die Verteilung der Chromosomenzahl von 200 Metaphaseplatten nicht wesentlich unterscheidet von der Verteilung der Chromosomenzahl der Kontrollkulturen. Beide Kurven haben bei 22 Chromosomen pro Mitose ihr Maximum. Die Zahl der Mitosen mit höherer Chromosomenzahl ist bei den hypoxischen Zellen leicht erhöht. Die Zahl der Mitosen mit mehrfachem Chromosomensatz wurde nicht bestimmt, scheint jedoch ebenfalls nicht wesentlich höher zu liegen als bei den Kontrollen.

2. Messung der Proliferation

2.1 Wachstum

2.1.1 Kontrollen

Die Wachstumskurven der chin. Hamsterzellen unter Normalbedingungen zeigen nach einer anfänglichen Verzögerung (lag-Phase) von etwa 6 h, in denen sich die Zellen von der Trypsineinwirkung erholen, einen exponentiellen Anstieg der Zellzahl. Nach 72 h verlangsamt sich jedoch die Wachstumsrate der Zellen wegen Erschöpfung des Nährmediums und wegen zunehmender Übervölkerung, so daß die im halb-logarithmischen Maßstab lineare Kurve allmählich in ein Plateau abbiegt. Die Wachstumsrate vermindert sich dabei exponentiell. Dementsprechend ist die Zellverdopplungszeit nur in einem bestimmten Zeitabschnitt konstant und nimmt anschließend exponentiell zu (vgl. Abb. 7).

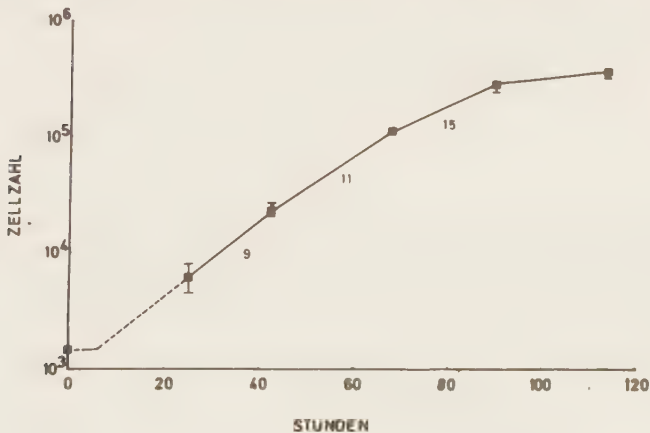


Abb. 7

Wachstum der Zellen unter Normalbedingungen bis 120 h nach der Aussaat. Nach einer Wachstumsverzögerung (lag-Phase) folgt der exponentielle Anstieg der Zellzahl (log-Phase). Wie die Steigung zwischen den einzelnen Meßpunkten

zeigt, nimmt die Zuwachsrate der Zellen ab - die Kurve mündet in ein Plateau (Plateau - Phase). Die Zahlen zwischen den Meßpunkten geben die einzelnen Verdopplungszeiten an. Die mittlere Verdopplungszeit im exponentiellen Kurventeil beträgt 11,7 h.

Sie beträgt bei den einzelnen Versuchen zwischen 11 - 16 h (vgl. Abb. 8).

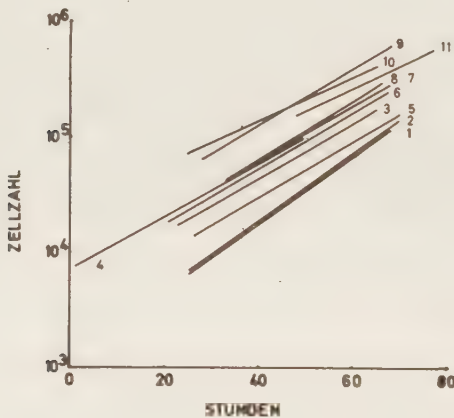


Abb. 8

Exponentielle Abschnitte von 11 Wachstumskurven. Die Verdopplungszeiten betragen: 1) 11 h, 2) 11 h, 3) 13 h, 4) 13 h, 5) 13 h, 6) 12 h, 7) 13 h, 8) 12 h, 9) 12,5 h, 10) 15 h, 11) 16 h.

Im Mittel braucht die Kultur $12,86 \pm 1,5$, d.h. ca. 13 h zu einer Verdopplung.

Die Unterschiede bei den Verdopplungszeiten kommen durch Abweichungen in den Wachstumsbedingungen bei den einzelnen Versuchen zustande. So spielt die Anzahl der Passagen und der Grad der Anpassung an ein bestimmtes Serum eine große Rolle. Aber auch verschiedene Kulturgefäße verursachen Änderungen des Wachstumsverhaltens. Ein Beispiel ist der

Vergleich des Zellwachstums in Glas- und Plastikflaschen. In Plastikflaschen erhöht sich die Verdopplungszeit der Kultur in der Regel auf $15,4 \pm 2,1$ h, die Wachstumsrate nimmt außerdem wesentlich früher ab als bei Zellen, die in Glasflaschen wachsen (vgl. Abb.10).

2.12 Hypoxische Kulturen

Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie in dieser Versuchsanordnung erreicht werden ($< 1 \mu\text{M/l O}_2$) tritt besonders bei den Versuchen, in denen Kulturflaschen aus Glas verwendet werden, eine Veränderung im Verlaufe der Wachstumskurve im Vergleich zu derjenigen unter Normalbedingungen auf. Wenige Stunden nach Beginn der hypoxischen Bedingungen biegt die vormals ansteigende Kurve ab und mündet spätestens nach 12 h in ein Plateau ein (vgl. Abb.9).

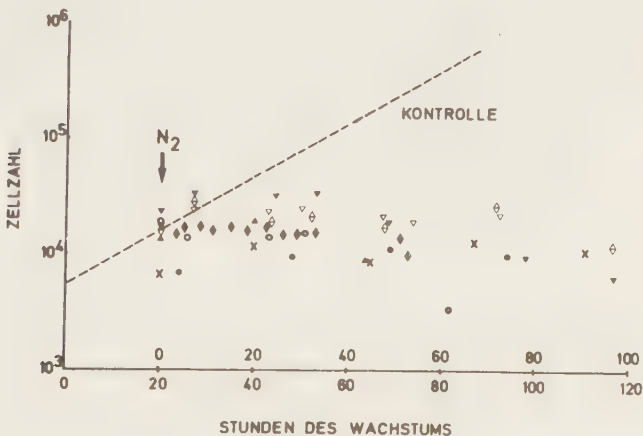


Abb. 9 Zellwachstum in Glasflaschen unter chronischer Hypoxie. 20 h nach der Zellaussaat wurde mit den hypoxischen Bedingungen begonnen. Bis zu 100 h lang wurde die Zellzahl bestimmt. Es sind die Daten von 8 Versuchen aufgeführt.

Die Zellkultur erreicht nicht einmal eine volle Zellverdopplung. Nach weiteren etwa 48 h beginnt die Zellzahl der hypoxischen Kultur abzunehmen.

Die einzelnen Versuche unterscheiden sich durch den Beginn der Plateauphase und den Zeitpunkt der Verringerung der Zellzahl. Diese Schwankungen sind unter anderem auf die schon bei den Kontrollkulturen erwähnten Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der Zellen zu den verschiedenen Kulturzeiten zurückzuführen. Leichte Abweichungen im Grad der Hypoxie, wie sie durch unterschiedliche Gasdurchflußraten oder durch verschiedene Zelldichte im Kulturgefäß und die damit verbundene unterschiedliche Geschwindigkeit der Sauerstofferschöpfung entstehen können, beeinflussen ebenfalls den Verlauf der Wachstumskurve.

Wie stark das Zellwachstum von der im Medium vorhandenen Sauerstoffkonzentration abhängt, zeigen besonders die Versuche, bei denen Plastik- statt Glasflaschen als Kulturgefäße verwendet wurden. Abb. 10 zeigt, wie gering die Abweichung der Wachstumskurve der mit $N_2 + CO_2$ begasten Zellkulturen in den ersten 24 h von der Kontrollkurve bei Verwendung von Plastikflaschen ist.

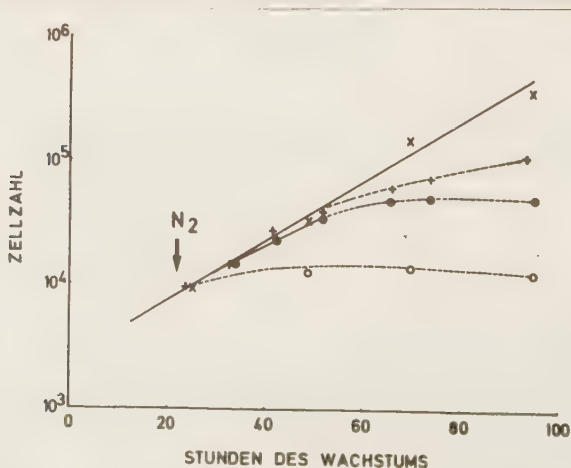


Abb. 10 Zellwachstum in Glasflaschen unter Normalbe-

dingungen (x) und unter chronischer Hypoxie (o), sowie Zellwachstum in T₃₀-Plastikflaschen unter Normalbedingungen (+) und unter chronischer Hypoxie (●). Die hypoxischen Bedingungen begannen 22 h nach Zellaussaat.

Nach rund 24 h nimmt jedoch die Verdopplungszeit auch der hypoxischen Zellkultur deutlich zu. Ebenso wird die Plateauphase von den Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen in Plastikflaschen wachsen, wesentlich früher erreicht als von denen, die in Plastikflaschen unter euoxischen Bedingungen wachsen. Der Grund dafür, daß sich die Zellen in den ersten 24 h chronischer Hypoxie fast normal vermehren, liegt darin, daß in dem Polystyrol, aus dem die Wände der Plastikflasche bestehen, sich Sauerstoff in hoher Konzentration gelöst befindet (Chapman u.a. 1968, Davies und Baker 1970, Born und Hug 1970). Durch langsames Ausdiffundieren in das Medium werden die Zellen so lange ausreichend mit Sauerstoff versorgt, bis der größte Teil verbraucht ist und die Nachdiffusion aus der äußeren Atmosphäre nicht mehr ausreicht, um das normale Wachstumsverhalten der Zellen zu ermöglichen (vgl. auch Boag 1969).

2.2 Koloniebildungsfähigkeit (Überlebensrate)

2.21 Kontrollen

Die Überlebensrate der unter Normalbedingungen kultivierten Zellen kann zwischen ca. 50 - 100 % schwanken. Im Mittel beträgt die Koloniebildungsfähigkeit der Zellkultur $86,5 \pm 13 \%$.

2.22 Hypoxische Kulturen

Bei zunehmender Dauer der Hypoxie nimmt der Anteil der Zellen mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung

rasch ab. In Abb. 11 wird deutlich, daß schon nach 2 h Hypoxie die Überlebensrate der Zellen abnimmt. Nach 6 - 8 h beträgt sie nur noch etwa 50 %, nach 24 h etwa 25 % und nach 48 h etwa 13 %.

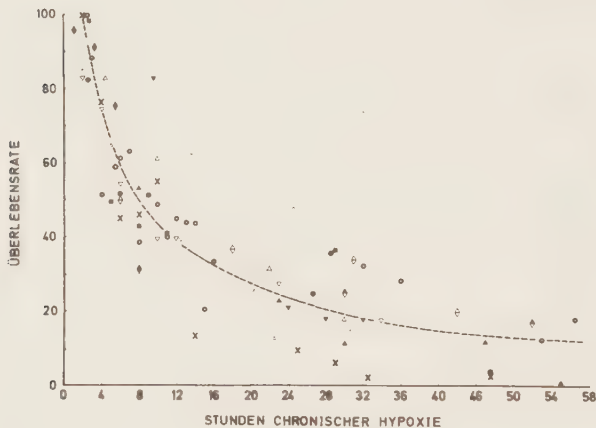


Abb. 11 Überlebensrate (Koloniebildungsfähigkeit) nach zunehmenden Zeiten chronischer Hypoxie. Es sind die Daten von 14 Versuchen aufgetragen.

In Abb. 12 sind die Ergebnisse von 6 Versuchen auf doppellogarithmischem Papier aufgetragen. Nach einem anfänglich horizontalen Verlauf fällt die Überlebensrate bei den einzelnen Versuchen etwa linear mit der Zeit ab; die Werte liegen auf einer hyperbolen Kurve.

Abb. 13 zeigt die Aufteilung der hypoxischen Zellen in noch lebende und in überlebensfähige im Verlaufe von 5 Tagen chronischer Hypoxie. Es handelt sich um die Darstellung eines einzelnen Versuchs. Zellen, die den Farbstoff Eosin im Lebendpräparat inkorporiert hatten,

wurden als tote Zellen registriert. Die obere Kurve stellt die Wachstumskurve der Zellen unter Normalbedingungen dar; es wurden diejenigen Zellen ausgewertet, die am Boden des Kulturgefäßes festsaßen. Bei den unteren 3 Kurven handelt es sich um die chronisch hypoxischen Zellen. Nach etwa 7 h Hypoxie findet keine Zellvermehrung mehr statt. Die Zahl der noch am Boden der Kulturflasche festsitzenden Zellen nimmt nach ca. 24 stündiger Hypoxie zunehmend ab. Das bedeutet, daß sich immer mehr Zellen ablösen und als Zelldebris im Medium schwimmen. Die Abbildung zeigt dazu deutlich, daß ein Teil der festsitzenden Zellen schon tot ist, denn die Zahl der lebenden Zellen nimmt rascher ab.

Die Überlebensrate der noch lebenden Zellen, gemessen an der Koloniebildungsfähigkeit nimmt nach Abb. 11 und 12 schon in den ersten 24 h chronischer Hypoxie exponentiell ab; sie kann daher nicht der Kurve der lebenden Zellen auf Abb. 13 folgen, die eine Schulter aufweist, sondern muß darunter liegen.

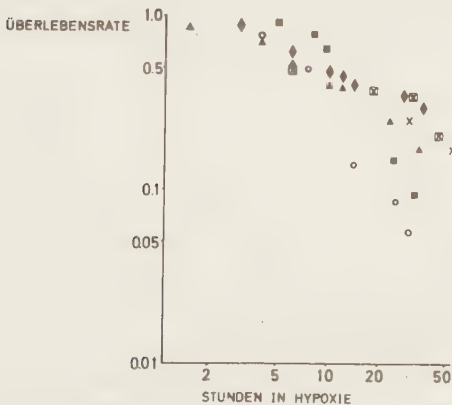


Abb. 12 Überlebensrate (Koloniebildungsfähigkeit) nach zunehmenden Zeiten chronischer Hypoxie. Die Daten von 6 Versuchen sind im doppellogarithmischen Diagramm aufgetragen.



Abb. 13 Wachstum der Zellen unter Normalbedingungen: Zählung aller am Glasboden festsitzenden Zellen (-- ■ --). Wachstum der Zellen unter chronischer Hypoxie: Zählung der festsitzenden und der im Medium schwimmenden Zellen (- ▲ -). Zählung der festsitzenden Zellen (- ○ -). Zählung der lebenden Zellen - Eosinausschluß (- ▽ -).

3. Zellzyklusparameter

3.1 Mitose

3.11 Mitoseindex

3.111 Kontrollen

Der Mitoseindex ist gegeben durch die Dauer der Mitose und der Generationszeit. Aber auch die growth-fraction, d.h. der Anteil zyklisierender Zellen in der Population

und die Altersverteilung der Zellen beeinflussen den Mitoseindex ebenso wie Synchronisationsvorgänge.

Abb. 14 zeigt die Verteilung des Mitoseindex (MI) über den Zeitraum eines Versuches.

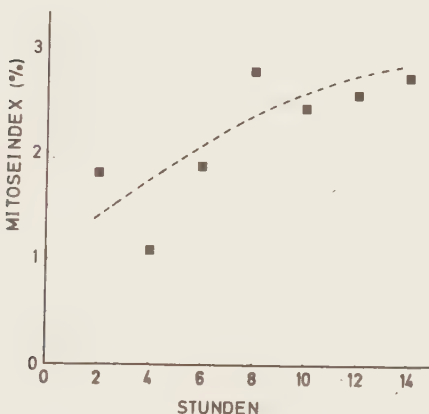


Abb. 14 Mitoseindex zu verschiedenen Zeiten nach Beginn eines Markierungsversuches.

Tabelle 1:

Zeit (h)	2	4	6	8	10	12	14
MI (%)	1,81	1,09	1,90	2,85	2,45	2,58	2,75

Wie in Abb. 14 und Tabelle 1 zu sehen ist, schwanken die Einzelwerte untereinander erheblich, besonders die Anfangs- und Endwerte. Es wird an diesem Versuch, der nur zur Bestimmung des Markierungsindex diente, deutlich, daß der

Mitoseindex einer Kultur durch eine einmalige Messung nicht sicher bestimmt werden kann.

Tabelle 2:

Zeit (h)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
MI (%)	3,3	3,0	3,0	4,1	2,5	2,4	1,5	1,6

Tabelle 2 gibt eine weitere Übersicht über Schwankungsbreiten des Mitoseindex innerhalb kurzer Zeiträume. Hier liegt eine Streuung der Werte zwischen 1,5 bis über den doppelten Wert vor.

Zur Bestimmung des wahren Mitoseindex können diese Versuche nicht ohne weiteres verwendet werden. Die Ursache für die großen Abweichungen innerhalb der Versuche liegt nicht immer an der eventuellen Teilsynchronisation durch die Hantierung der Zellkultur während der Markierung, sondern kann auch methodischer Natur sein. Da die Zellen in der Mitose abgerundet sind, lösen sie sich leicht vom Boden des Kulturgefäßes oder des Objektträgers ab und entgehen damit der Auswertung. Sobald bei der Herstellung der Präparate besondere Sorgfalt aufgewendet wurde (vgl. S. 39), konnten einheitlichere Ergebnisse erzielt werden. Wie erwartet, ist der Mitoseindex in diesem Fall höher.

Tabelle 3:

Methode	normal	sorgfältig (Objektträger)	sorgfältig (Trypsinierung)
MI (%)	$2,37 \pm 1,5$	$3,3 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,5$

Tabelle 3 zeigt den mittleren Mitoseindex von 8 Einzelmessungen bei verschiedenen Präparationsmethoden.

Der gemessene Mitoseindex hängt also auch von der Methode der Zellpräparation ab. Neben einer Erhöhung des mittleren Mitoseindex vermindert sich die Standardabweichung.

Bei der Bestimmung des Mitoseindex spielt noch der Auswertungsmodus eine Rolle. So muß die Zahl der ausgewerteten Zellen in einem adäquaten Verhältnis zur Zahl der Mitosen stehen und es müssen immer die gleichen Mitosebilder gezählt werden. Es wurden alle Mitosen von der späten Prophase bis einschließlich der Anaphase gewertet. Bei der Aufbereitung der Zellen nach der Abtryspinierung werden die Mitosen zufällig auf dem Objektträger verteilt, so daß die Abweichungen, die durch die Auswertung nur bestimmter Ausschnitte des Präparates bedingt sind, geringer bleiben. Der höhere Mitoseindex der rechten Spalte der Tabelle 3 kommt wohl dadurch zustande, daß bei der verwendeten Methode die wenigsten Mitosen verloren gingen. Möglicherweise erhöht sich der Mitoseindex jedoch deswegen, weil die späten Anaphasen als zwei Metaphasen statt einer gewertet wurden, denn diese Zellen werden bei der Trypsinierung getrennt. Bei den folgenden Rechnungen wird als Mitoseindex der normalen Zellkultur daher der Wert 3,3 angenommen.

3.112 Hypoxische Kulturen

Der Mitoseindex nimmt unter hypoxischen Bedingungen rasch ab. Abb. 15 zeigt, daß er innerhalb von 6 - 8 h kontinuierlich von 3,3 % (vgl. Kontrolle) auf 0,44 % mit einer Standardabweichung von $\pm 0,246$ % abnimmt. Diesen Wert von fast 0,5 % zeigt der Mitoseindex innerhalb von 8 - 24 h chronischer Hypoxie. Selbst nach 48 h chronischer

Hypoxie kann noch ein Mitoseindex von rd. 0,5 % beobachtet werden.

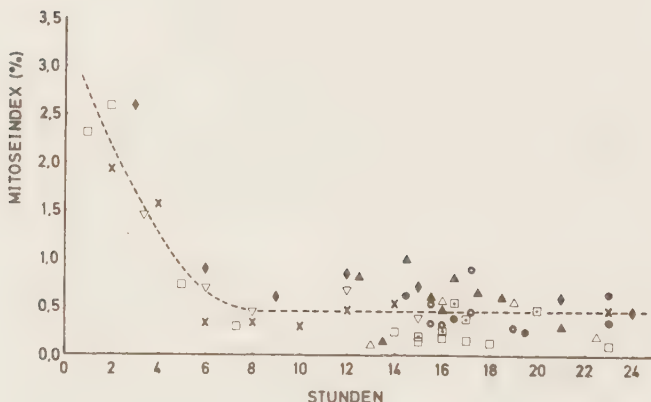


Abb. 15 Mitoseindex nach zunehmenden Zeiten chronischer Hypoxie. Es sind die Daten von 9 Versuchen aufgetragen: 1. (x), 2. (◆), 3. (▲), 4. (□), 5. (△), 6. (●), 7. (○), 8. (◻), 9. (▽).

Die Veränderung des Mitoseindex der Zellkultur mit der Dauer der Hypoxie wurde meist nur neben der Bestimmung des Markierungsindex mitgemessen. Es wurden schon aus diesem Grund die bei der Auswertung der Kontrollversuche beobachteten Abweichungen der Einzelwerte erwartet und, wie die Werte der Abb. 14 zeigen, auch gefunden.

Bei dem Versuch Nr. 4 (vgl. Abb.15) liegen die Einzelwerte meist unter der in Abb. 15 abgebildeten Kurve,

bei dem Versuch Nr. 2 liegen alle über ihr. Je nach der Überlebensfähigkeit der Zellen unter Normalbedingungen erfolgt zu den verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsbeginns eine mehr oder weniger schnelle Reaktion auf die chronische Hypoxie. Aber auch ein unterschiedlicher Grad der Hypoxie kann sich auf diese Weise auswirken. Nur eine große Anzahl von Versuchen erlaubt daher genaue Aussagen über die Wirkung der chronischen Hypoxie auf den Mitoseindex. Der bei den Kontrollen gefundene Einfluß der Präparationsmethode auf den Mitoseindex muß auch bei den hypoxischen Kulturen beachtet werden. Auch bei sorgfältigster Behandlung der Präparate wird nach 14 h Hypoxie im allgemeinen kein höherer Mitoseindex als 0,5 % erzielt. Versuche, in denen die Zellen abtrypsiniert wurden und aufbereitet auf die Objektträger kamen, zeigten entgegen den Erwartungen (vgl. Kontrollen) sehr niedrige Mitoseindizes, wahrscheinlich weil die Zellen - besonders diejenigen in der Mitose - nach 14 h Hypoxie gegen mechanische Einflüsse, wie Zentrifugation, sehr empfindlich geworden sind.

In den ersten 24 h chronischer Hypoxie wird ein mittlerer Wert des Mitoseindex von ca. 0,5 % angenommen. Für die Berechnung der Mitosedauer in einzelnen Versuchen muß er allerdings separat bestimmt werden.

3.12 Mitosedauer

3.121 Kontrollen

Die Mitosedauer (T_M) berechnet sich aus dem Mitoseindex (MI) und der Generationszeit (T_C):

$T_M = T_C \times MI/100 \times \ln 2$ (h) (Stanners und Till 1960)
 oder $T_M = T_C \times \log (MI + 1)/\log 2$ (h) (Puck und Steffen 1963). Wird der mittlere Mitoseindex von 3,3 % und eine mittlere Generationszeit von ca. 13 h eingesetzt, so erhält man eine Mitosedauer von 0,618 h oder 37,1 min. Der Anstieg des Mitoseindex nach Colcemideinwirkung wurde in 4 Versuchen ermittelt und zur Berechnung der Mitosedauer verwendet. Es gilt dabei:

Mitosedauer (T_M) = Mitoseindex (MI) / Steigung (vgl. II/4.41)

Tabelle 4:

Vers. Nr.	Gleichung der Geraden	Steigung (%/h)	MI (%)	T_M (h)	T_M (min)	Steigung :ln2(%/h)	T_C (h)
1	$y=1,6+3,9x$	3,9	2,5	0,64	38,5	5,63	17,7
2	$y=1,26+3,05x$	3,05	2,0	0,65	39,3	4,4	22,7
3	$y=2,03+5,9x$	5,9	3,3	0,56	33,6	8,5	11,78
4	$y=3,25+4,95x$	4,95	3,5	0,71	42,4	7,15	14,0

Die mittlere Mitosedauer beträgt in diesen Versuchen 38,5 min und stimmt mit der Mitosedauer von 37,1 min, die aus dem mittleren Mitoseindex und der mittleren Generations- und Verdopplungszeit berechnet wurde, gut überein.

Aus der korrigierten Steigung (gefundene Steigung /ln 2) läßt sich die Generationszeit (T_C) errechnen:

$$T_C = 100 (\%): \text{korr. Steigung } (\%/h)$$

Die Ergebnisse zeigen, daß die Mitosedauer auch bei größeren Unterschieden in der Generationszeit relativ konstant bleibt (vgl. rechte Spalte der Tabelle). Die Steigung des Mitoseindex wurde jeweils nur über 3 - 4 h beobachtet, da bei einer zu großen Anzahl mitotischer

Zellen der Verlust der Mitosen bei der Präparation sehr stark zunehmen würde, ebenso wie die Zahl der Zellen, die die Mitose trotz Hemmstoff nach einiger Zeit vollenden können oder aber degenerieren.

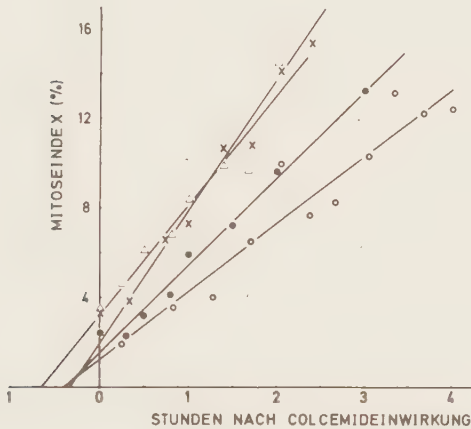


Abb. 16 Anstieg des Mitoseindex nach Colcemideinwirkung. Es sind die Daten von 4 Versuchen aufgetragen, 1. (●), 2. (○), 3. (X), 4. (Δ). Die Gleichungen der durch die Werte gelegten Geraden sind in Tabelle 4 aufgeführt.

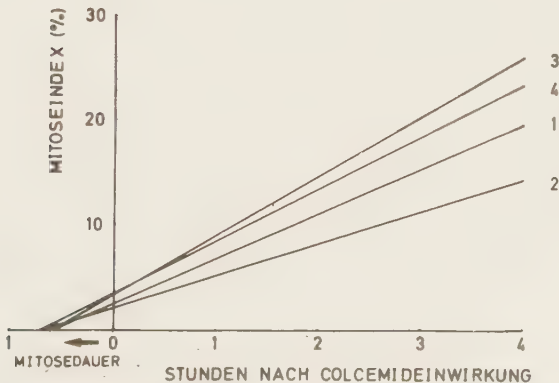


Abb. 17 Graphische Bestimmung der Mitosedauer der 4 Versuche mit Hilfe der Steigung des Mitoseindex pro

Zeiteinheit nach Colcemideinwirkung (vgl. S. 37). Die Mitosedauer entspricht dem Abschnitt links von der Ordinate auf der Zeitskala. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Abb. 16 zeigt die experimentellen Werte im Diagramm und Abb. 17 eine graphische Darstellung der Mitosedauerbestimmung der 4 Versuche. Es wird die experimentell gefundene Steigung und der dazugehörige Mitoseindex bei Normalbedingungen verwendet. Die Verlängerung der Anstiegsgeraden nach links schneidet die Abszisse in dem Anfang des Generationszyklus, der den Zeitraum umfaßt, in dem der Mitoseindex von 0 - 100 % ansteigt. Der kurze Abschnitt links von der Ordinate auf der Abszisse entspricht der Mitosedauer und stimmt mit den errechneten Werten überein.

Die Anstiegsgerade wurde bei der graphischen Ermittlung der Mitosedauer nicht direkt nach links verlängert, sondern durch den Mitoseindex bei Normalbedingungen gelegt ($x/y = O/MI$), da wegen der Anaphasen der Mitosen, die zu Versuchsbeginn der Colcemidhemmung entgangen sind, mit einer Verzögerung des Anstieges von etwa einer halben Mitosedauer zu rechnen ist.

Die Versuche wurden mit etwas unterschiedlichen Methoden der Zellpräparation durchgeführt. So wurden im Versuch Nr. 4 mit der Steigung 5,0 %/h die Zellen nicht auf den Objektträgern gezüchtet, sondern abtrypsinisiert, so daß - wie schon erwähnt - eventuell der Mitoseindex des Nullpunktes, der ohne Colcemideinwirkung bestimmt wurde, zu hoch liegt. Da bald nach der Colcemidgabe keine Anaphase der Mitose mehr auftreten kann, wirkt sich der Effekt nicht auf die Steigung des Mitoseindex aus. Die Dauer der errechneten Generationszeit ist daher nicht verfälscht. Die Dauer der Mitose dagegen fällt dadurch sehr lang aus, wie die erhaltene Dauer von 42,4 min zeigt.

Der besonders niedrige Mitoseindex des Nullpunkts im Versuch Nr. 2 kann ebenso wie im Versuch Nr. 1 dadurch zustande gekommen sein, daß noch nicht die größte Sorgfalt auf die Erfassung sämtlicher Mitosen angewendet wurde. Der entstandene Fehler überträgt sich auch auf den Anstieg des Mitoseindex, so daß sich im Resultat der Fehler bei der Berechnung der Mitosedauer aufhebt, nicht aber bei der Errechnung der Generationszeit, die daher zu lang ausfällt.

3.122 Hypoxische Kulturen

Unter der Voraussetzung, daß die Altersverteilung der hypoxischen Kultur trotz fehlender Zellvermehrung nach 14 h Hypoxie noch der einer exponentiell wachsenden Zellkultur entspricht, kann zur Mitosedauerberechnung die Formel $T_M = T_C \times MI/100 \times \ln 2$ (h) verwendet werden. Bei einem Mitoseindex von 0,5 % und einer Generationszeit von z.B. 80 h erhält man eine Mitosedauer von rund 35 min. Setzt man 100 statt 80 ein, so erhöht sich die Mitosedauer auf rund 44 min. Eine wesentliche Abweichung von den ca. 34 min Mitosedauer der Kontrollkulturen ist damit nicht gegeben. Nimmt man ein steady-state-Wachstum der mindestens 14 h chronisch hypoxischen Zellen an, so verkürzt sich die errechnete Mitosezeit sogar im Vergleich zu den Werten der Kontrollkultur. Im Fall einer Plateau-Phase dagegen kann die obige Formel zur Berechnung der Mitosedauer nicht verwendet werden, da sich dann nicht alle Zellen gleichmäßig im Zyklus befinden.

Durch Akkumulierung der Mitosen nach Colcemidgabe wurde der Anstieg des Mitoseindex mit der Zeit ermittelt und versucht, die Mitosedauer und auch die Generationszeit zu berechnen.

Tabelle 5:

Vers. Nr.	Gleichung	Steigung (%/h)	T_M (h)	T_M (min)	Steigung/ $\ln 2$ (%/h)	T_C (h)
1	$y=0,176x+0,2$	0,18	1,0	63	0,26	385
2	$y=0,78x+0,91$	0,78	1,17	70	1,125	89
	$y=0,54x+0,41$	0,54	0,76	45	0,78	128

Tabelle 5 zeigt die Steigung des Mitoseindex bei 3 Versuchen und die daraus bestimmten Mitose- und Generationszeiten. Es wurde hier angenommen, daß die 14 h chronisch hypoxischen Zellen eine Art exponentieller Altersverteilung aufweisen.

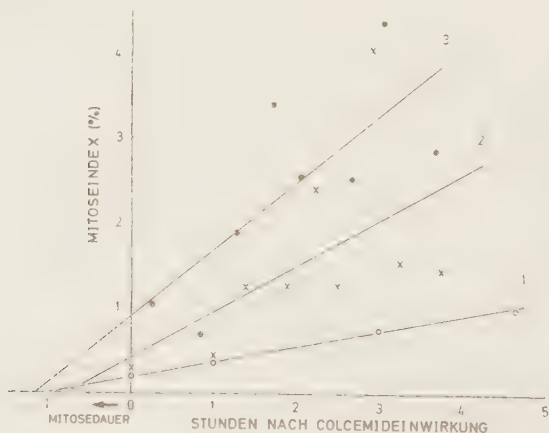


Abb. 18 Anstieg des Mitoseindex nach 14 h chronischer Hypoxie und Colcemideinwirkung. Es sind die Daten von 3 Versuchen aufgetragen: 1. (O), 2. (●), 3. (X). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Die Mitosedauer wurde hier dem Diagramm der Abb. 18 entnommen, da der Mitoseindex vor der Colcemideinwirkung

nicht bei allen Versuchen präzise bestimmt wurde. Dazu wurde die aus den Werten berechnete Anstiegsgerade nach links im Diagramm durchgezogen und der Abschnitt auf der Abszisse abgelesen. Vergleicht man den Schnittpunkt der Anstiegsgeraden mit der Ordinate und die Lage der einzelnen Punkte im Diagramm, so wird deutlich, daß keine Verzögerung des Anstiegs des Mitoseindex nach Colcemidgabe vorliegt. Die Streuung der Einzelwerte ist allerdings sehr groß und erlaubt daher keine genaue Aussage über die Größe des Mitoseindex zu Beginn des Versuches. Es bleibt dahingestellt, ob eine Verzögerung der Colcemidwirkung bei hypoxischen Zellkulturen eintritt oder nicht. Falls jedoch wie bei den Kontrollkulturen die Anaphasen die Mitose vollenden können, so bedeutet dies eine Zunahme der Mitosedauer der hypoxischen Kulturen um mindestens $1/3$ der zunächst bestimmten Zeit.

Die Steigung von $0,18 \text{ \%}/\text{h}$ im Versuch Nr. 1 ist sehr gering und läßt auf einen methodischen Fehler schließen. Tatsächlich wurden die Präparate bei den Spülvorgängen unvorsichtig transportiert und es wurde hypotone Lösung verwendet. Möglicherweise ist dadurch ein Großteil der Mitosen verloren gegangen. Wie schon bei den Kontrollversuchen diskutiert wurde, wirkt sich der dabei entstehende Fehler nur bei der Bestimmung der Generationszeit mit Hilfe der korrigierten Steigung des Mitoseindex aus, nicht aber bei der Ermittlung der Mitosedauer. Diese hat sich im Versuch Nr. 1 auf knapp über eine Stunde erhöht. Bei dem Versuch Nr. 2 mit der Steigung des Mitoseindex von $0,78 \text{ \%}/\text{h}$ beträgt die Mitosedauer $1,17 \text{ h}$. Dieser Wert kommt dadurch zustande, daß die Anstiegsgerade die Ordinate bei einem Mitoseindex von $0,91 \text{ \%}$ schneidet. Der im Vergleich zu den anderen Versuchen hohe Mitoseindex ist verbunden mit einem rascheren Anstieg des Mitose-

index nach Colcemidgabe. Dennoch wird etwa eine Verdopplung der Mitosezeit gefunden. Der Mitoseindex des Versuchs Nr. 3 steigt um 0,54 % pro Stunde. Die Verlängerung der Geraden bis zum Schnittpunkt mit der Abszisse grenzt eine Mitosedauer von 0,75 h oder 45 min ab, die damit knapp über dem Kontrollwert liegt. Angesichts der großen Fehlerbreite der Methode kann eine Verlängerung der Mitosedauer nicht ausgeschlossen werden. Der höchste mit Hilfe der Colcemidmethode gemessene Wert entspricht etwa einer Verdoppelung des normalen Wertes. Die Berechnung der Mitosedauer mit Hilfe des Mitoseindex und der geschätzten Generationszeit ergab keine Verlängerung der Mitosedauer. Obwohl diese Methode zur Bestimmung der Mitosedauer fraglich ist, ist dies Ergebnis noch vereinbar mit demjenigen der Colcemidversuche.

3.2 Generationszeit

3.21 Kontrollen

Die Generationszeit entspricht der Verdopplungszeit, wenn die growth-fraction 1 ist, d.h. der Anteil der sich an der Zellvermehrung beteiligenden Zellen 100 % beträgt. Die Versuche der Dauermarkierung haben gezeigt, daß nach Ablauf der maximalen G_1 -, G_2 - und M-Phasezeiten der Markierungsindex bis auf 100 % ansteigt; d.h. alle Zellen befinden sich im Zyklus und die Verdopplungszeit entspricht der Generationszeit. Die mittlere Verdopplungszeit und somit Generationszeit, die aus den Wachstumskurven bestimmt wurde; beträgt ca. 13 h. Außerdem läßt sich die Generationszeit mit Hilfe des Markierungsindex und der Mitosedauer aus der Beziehung

$$T_C = T_M \times \ln 2 \times 100/MI$$

bestimmen (vgl. S.36). Setzt man einen Mitoseindex von 3,3 % und eine Mitosedauer von 0,6 h ein, so erhält man eine Generationszeit von ca.12,6h. Zusätzlich läßt sich die Generationszeit aus der Gleichung:

$$T_C = T_S \times 100 \times 0,9/LI$$

berechnen, d.h. mit Hilfe des Markierungsindex und der S-Phasendauer, wobei die Lage der S-Phase in der Altersverteilung der exponentiell wachsenden Zellkultur berücksichtigt wurde.

Setzt man die Ergebnisse der Versuche der Dauermarkierung ein (vgl. S. 88), d.h. einen Markierungsindex von 56,5 % und eine S-Phasendauer von 7,9 h, so errechnet sich eine Generationszeit von 12,6 h.

Eine direkte Messung der Generationszeit und dazu der einzelnen Zyklusphasen erfolgt unter Verwendung der Methode zur Bestimmung der Kurven der markierten Mitosen.

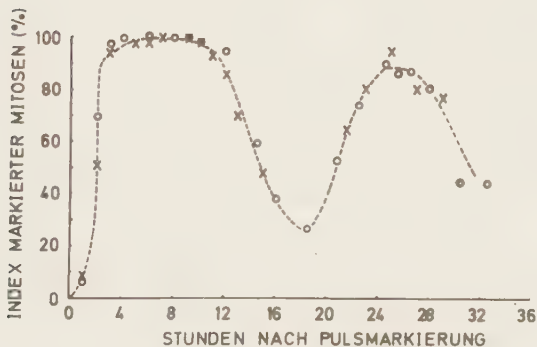


Abb. 19 Kurve der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung bei Normalbedingungen. Die Daten des 1. Versuchs (x) und des 2. Versuchs (o) liegen auf der gleichen Kurve. Der Markierungsindex (LI) beträgt

1. 78,5 % und 2. 63,0 %. Die Kurvenparameter sind:
 $(T_{G_2} + T_{M/2}) = 2 \text{ h}$, $T_S = 13 \text{ h}$, $(T_{G_1} + T_{M/2}) = 3 \text{ h}$,
 $T_C = 18,5 \text{ h}$.

Abb. 19 zeigt die ersten 2 Versuche mit sich überlagernden Kurvenbildern. Die Kurvenparameter betragen: G_2 -Phasendauer mit halber Mitosedauer = 2 h, S-Phasendauer = 13 h, G_1 -Phasendauer mit halber Mitosedauer = 3,5 h, Generationszeit = 18,5 h. Setzt man die Generationszeit und die S-Phasendauer in die Gleichung $LI = T_S \times 100 \times 0,9/T_C$ (vgl. S. 20) ein, so erhält man einen Markierungsindex von 63,3 %. Die Auswertung der Präparate ergab bei einem Versuch den Markierungsindex von 63 % und bei dem anderen Versuch einen von 78,5 %. Setzt man diese Werte in die Gleichung ein, so betragen die Differenzen zwischen den Generations- oder S-Phasezeiten bis zu 4 h. Der gleiche Kurvenverlauf in beiden Versuchen deutet darauf hin, daß nach der Pulsmarkierung, die in diesen Fällen mit Mediumwechsel verbunden war, der Ablauf des Zellzyklus in beiden Versuchen gleich war, daß aber der Markierungsindex die Verhältnisse vor der Markierung anzeigt, die durchaus verschieden gewesen sein konnten. Die sich aus den Kurven ergebenden Generationszeiten sind ungewöhnlich lang und auf die hohen S-Phasezeiten zurückzuführen, die wohl Artefakte der speziellen Versuchsanordnung waren und zu einer Teilsynchronisation geführt hatten.

Abb. 20 zeigt keine derartigen Artefakte. Die Generationszeit ist mit einer Dauer von 11,7 h dagegen kurz, ebenso wie die G_2 -Phase mit nur ca. 2 h. In diesem Versuch stimmt der Markierungsindex von 56 % recht gut mit dem erwarteten Wert überein, wenn man die erhaltenen Größen der S-Phase (7,5h) und der Generationszeit (11,7 h) zur Berechnung verwendet:

$$LI = \frac{T_S \times 100 \times 0,9}{T_C} = \frac{7,5 \times 100 \times 0,9}{11,7} = 57,5\%$$



Abb. 20

Kurve der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung bei Normalbedingungen (typisches Beispiel). Die Kurvenparameter sind: $(T_{G2} + T_{M/2}) = 1,7$ h, $T_S = 7,5$ h, $(T_{G1} + T_{M/2}) = 2,5$ h, $T_C = 11,7$ h. $LI = 56\%$.

Dies ist ein Beispiel für eine, unter besten Bedingungen, schnell wachsende Kultur. Im Durchschnitt haben die Zellkulturen jedoch Generationszeiten zwischen 12-13 h, wie die oben erwähnten Berechnungen mit Hilfe des Mitoseindex und der Mitosedauer, sowie mit Hilfe des Markierungsindex und der S-Phasendauer gezeigt haben. Die mittlere Verdopplungszeit beträgt ca. 13 h. Sie hat den größten Wert, da hier die Streubreite am größten ist. Man kann daher annehmen, daß die growth-fraction den Wert 1 hat, wie auch die Versuche der Dauermarkierung bestätigen, d.h. es befinden sich alle Zellen im Zyklus.

Die Kurve der markierten Mitosen in Abb. 20 kann als Beispiel einer ungestörten Wanderung der Zellen durch den Zellzyklus betrachtet werden. Die Dauer der einzelnen

Phasen, die sich aus der Kurve ergeben, sind bei Abb. 20 aufgeführt: $T_C = 11,7$ h; $T_S = 7,5$ h; $T_{G_2} + M/2 = 1,7$ h; $T_{G_1} + M/2 = 2,5$ h. Die Dauer der Mitose, die ca. 0,6 h beträgt (vgl. S. 58) ist in der Kurve zu gleichen Teilen auf die G_2 - und G_1 -Phase verteilt. Zur Bestimmung der G_2 -Phase wird daher der Wert 0,3 h von der aus der Kurve ermittelten G_2 -Phasendauer abgezogen; sie beträgt somit 1,4 h. Die G_1 -Phase wurde aus der Differenz der Summe der G_2 -, M- und S-Phasen von der Generationszeit berechnet; sie beträgt 2,2 h. Die Kurven der Abb. 19 und 20 zeigen Zykluszeiten von 18,5 und 11,7 h und liegen damit genau in dem Streubereich, der schon bei den Verdopplungszeiten der Wachstumskurven erhalten wurde. Falls alle Zellen der Kulturen bei den Wachstumsversuchen teilungsaktiv waren, kann man annehmen, daß die Kurven der Abb. 19 und 20 den zeitlichen Ablauf von Zellzyklen zu verschiedenen Zeitpunkten richtig darstellen.

3.22 Hypoxische Kulturen

Die Zellverdopplungszeit der 14 h chronisch hypoxischen Zellen geht gegen ∞ . Aus ihr lassen sich daher keinerlei Abschätzungen über die Generationszeit machen. Mit Hilfe des Mitoseindex und der Mitosedauer dagegen errechnet sich eine Generationszeit von ca. 80 h, wenn ein Mitoseindex von 0,5 % und eine Mitosedauer von ca. 0,6 h (Kontrollwert) eingesetzt wird: $T_C = T_M \times \ln 2 \times 100/MI$ (h). Wird eine Mitosedauer von 1 h angenommen, so erhöht sich die Generationszeit auf ca. 140 h. Auch unter der Annahme eines steady-state-Wachstums der chronisch hypoxischen Zellen, d.h. wenn nach jeder Mitose eine der Tochterzellen verloren ginge, würde sich die Generationszeit auf ca. 120 h

erhöhen ($T_C = T_M \times 100/MI$). Setzt man dagegen aufgerundet den Markierungsindex und die S-Phasendauer der 14 h chronisch hypoxischen Zellen (vgl. S. 90) in die Gleichung ein, so erhält man eine Generationszeit von nur 66 h :

$$T_C = T_S \times 100/LI = 40 \times 100/60 = 66 \text{ h.}$$

Unter der Voraussetzung, daß es sich noch um die Altersverteilung einer exponentiell wachsenden Zellkultur handelt, beträgt die Generationszeit nur noch 47 h : $40 \times 100 \times 0,7 / 60$ (λ hat etwa den Wert $\ln 2 = 0,7$, da die G_2 -Phase wesentlich kürzer als die G_1 -Phase ist, wie später gezeigt wird.

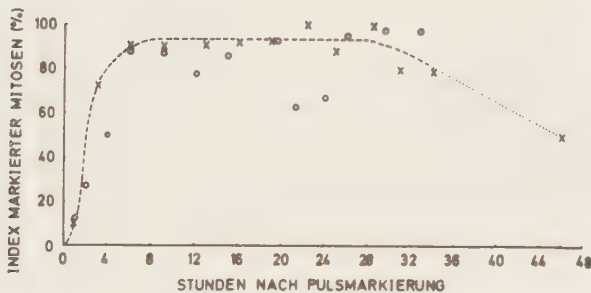


Abb. 21 Kurve der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung nach 14 stündiger Hypoxie. Die Kurvenparameter des 1. (X) und 2. Versuchs (O) sind: $(T_{G2} + T_{M/2}) = 2 \text{ h}$, $T_S = 40 \text{ h}$. $LI = 79 \%$ (1) und 43% (2).

Die Bestimmung der Generationszeit und der einzelnen Zyklusphasen mit Hilfe der Kurven der markierten Mitosen, die unabhängig ist von der Art der Zellverteilung, hatte folgende Ergebnisse: Abb. 21 zeigt die Kurven von 2 Versuchen, die nach 14 h chronischer

Hypoxie durchgeführt wurden. Nach einem Anstieg der markierten Mitosen bis zum 90%-Wert innerhalb von 6 h bleiben die experimentellen Punkte ca. 30 h lang auf einem Plateau. Im Gegensatz zu den Kontrollwerten, die alle genau auf einer Kurve liegen, streuen die Einzelwerte besonders des 2. Versuchs sehr stark. Die angedeutete Kurve, die durch die Werte des 1. Versuchs geleitet wurde, nimmt erst nach 30 h ab und erreicht nach 46 h einen 50%-Wert markierter Mitosen. Die atypische Form der Kurve der markierten Mitosen - das Verschwinden des sinusförmigen Verlaufes und Auftreten eines Plateaus - läßt auf tiefgreifende Veränderungen der Zellflußraten schließen. Es lassen sich keine Aussagen über die Länge der Generationszeit machen. Es ist jedoch deutlich, daß es sich um eine Verlängerung handelt, die zu einem großen Teil auf einer Verlängerung der S-Phase, hier auf ca. 40 h, beruht. Zur Bestimmung der Generationszeit der chronisch hypoxischen Zellen kann die Methode der markierten Mitosen nicht verwendet werden, da der Versuch sich über einen so langen Zeitraum erstrecken müßte, daß innerhalb dieser Zeit Änderungen der Zellflußraten stattfinden können, die eine Beurteilung der Ergebnisse erschweren.

3.3 G₂-Phasendauer

3.31 Kontrollen

Der überwiegende Teil der Zellpopulation besitzt eine G₂-Phasenlänge von 0,7 - 2,2 h. Die mittlere G₂-Phasendauer beträgt 1,36 h und hat einen Gipfelwert von 1,45 h.

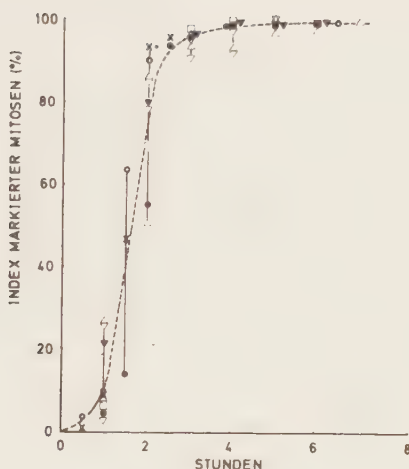


Abb. 22 Anstieg des Prozentsatzes markierter Mitosen mit der Zeit nach Puls- und Dauermarkierung unter Normalbedingungen. Es sind die Daten von 8 Versuchen aufgetragen. Die Dauer der G_2 -Phase und der halben Mitosezeit sind: 1. (X) = 1,5 h; 2. (●) = 2,0 h; 3. (○) = 1,5 h; 4. (△) = 2,0 h; 5. (□) = 1,85 h; 6. (▽) = 1,65 h; 7. (◇) = 1,3 h; 8. (▼) = 1,5 h; M = 1,66 h.

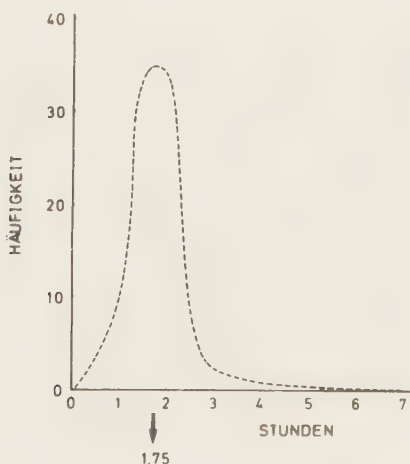


Abb. 23 Verteilung der G_2 -Phasenlänge mit halber Mitosedauer (Ableitung der Kurve der Abb. 22). Der Gipfelwert liegt bei 1,75 h.

In Abb. 22 sind die Werte von 8 Puls- und Dauermarkierungsversuchen dargestellt. Die durchgelegte Kurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Sie steigt nach einer Verzögerung von etwa 1 h in dem Zeitraum zwischen 1 - 2,5 h nach der Markierung rapide an, um sich dann asymptotisch dem 100 %-Wert der markierten Mitosen zu nähern. Der Wendepunkt der Kurve wurde durch die 1. Ableitung bestimmt (vgl. Abb 23). Er liegt bei 1,75, während die mittlere G_2 -Phasenlänge - d.h. die Zeit, in der die Zellpopulation 50 % markierte Mitosen aufweist - nur 1,66 beträgt. Da bei diesen Versuchen immer nur die Metaphasen der Mitose ausgewertet wurden, ist die Dauer der Mitose in etwa gleichen Teilen auf die G_1 - und die G_2 -Phase aufgeteilt. Bei einer Mitosedauer von 0,6 h müssen demnach 0,3 h jeweils abgezogen werden, so daß die mittlere G_2 -Phasendauer 1,36 h beträgt und die mediane G_2 -Phasendauer 1,45 h. Dieser Unterschied zwischen dem Gipfel- und dem Medianwert kann folgendes bedeuten: Obwohl die meisten Zellen eine G_2 -Phasendauer von 1,45 h besitzen, gibt es mehr Zellen mit kurzen als mit langen G_2 -Phasenzeiten, so daß die G_2 -Phasenlänge im Mittel nur 1,36 h beträgt.

Eine Übereinstimmung zwischen Mittel- und Medianwert ließe darauf schließen, daß die Häufigkeit der G_2 -Phasenlängen der Zellpopulation einer invers normalen Verteilung folgt. Die Form der Kurve (Abb. 23) ähnelt im oberen Bereich einer symmetrischen Glockenkurve, doch weicht sie in den Extremwerten von einer Normalverteilung ab. Die Häufigkeit der Zellen mit sehr langen G_2 -Phasenzeiten nimmt schnell ab, nähert sich jedoch dann asymptotisch der Abszisse.

3.32 Hypoxische Kulturen

Nach 14 stündiger Hypoxie hat sich der Gipfel der G_2 -Phasenlängenverteilung der Zellkultur nur unwesentlich von 1,75 auf 2,0 h verschoben. Neben der Verschiebung des Häufigkeitsmaximums ist das Auftreten von Zellen mit extrem langen G_2 -Phasen bemerkenswert. Die mittlere gemessene G_2 -Phasenlänge beträgt 2,0 h, wobei die tatsächliche G_2 -Phasendauer 1,7 h beträgt in der Annahme, daß die Mitose 0,6 h dauert.

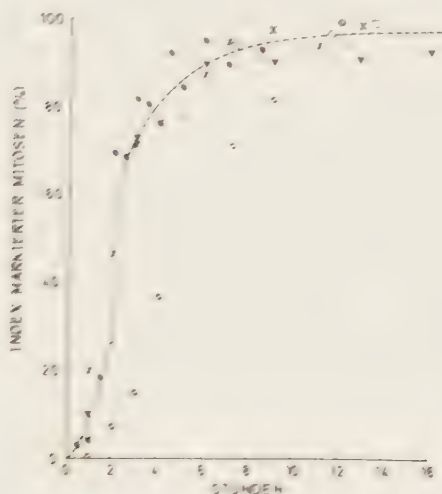


Abb. 24 Anstieg des Prozentsatzes markierter Mitosen nach Dauermarkierung, nach 14 h chronischer Hypoxie. Es sind die Daten von 6 Versuchen aufgeführt: 1. (X); 2. (●); 3. (○); 4. (△); 5. (□); 6. (▼).

Abb. 24 zeigt der Anstieg des Prozentsatzes markierter Mitosen. Die Kurve setzt sich aus den Werten von 6 Versuchen der Dauermarkierung zusammen. Im Vergleich zu

den Abbildungen der Kontrollkurven ist der Maßstab auf der Abszisse um die Hälfte verkleinert, um die sigmoide Kurve in einem ähnlichen Diagramm voll erfassen zu können. Die Werte des Versuchs Nr. 3 wurden bei der Zeichnung der Kurve nicht berücksichtigt, da sie zu stark herausfallen. Dieser Versuch demonstriert jedoch, daß bei bestimmten Bedingungen - in diesem Fall war die Überlebensrate der Zellen bei Normalbedingungen gering, gemessen an der Koloniebildungsfähigkeit - die Dauer der G_2 -Phase unter chronischer Hypoxie bedeutend verlängert sein kann. Sie beträgt hier 4,2 h im Gegensatz zu den Werten der anderen Versuche, die nur geringfügig um den Mittelwert von 1,75 h schwanken.

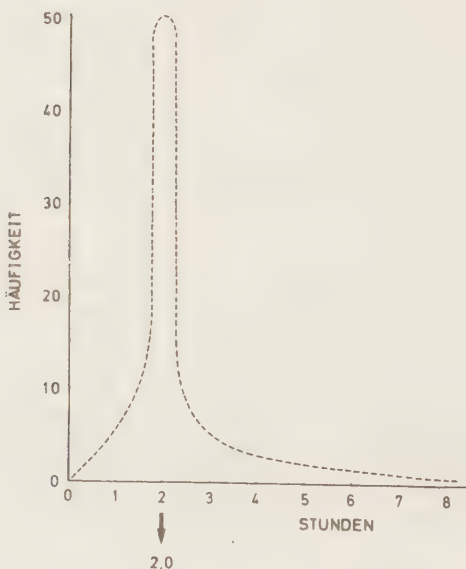


Abb. 25 Verteilung der G_2 -Phasenlängen mit halber Mitosedauer nach 14 h chronischer Hypoxie (Ableitung der Kurve der Abb. 19). Der Gipfelwert liegt bei 2,0 h.

Die Kurve der kumulativen Häufigkeit steigt beschleunigt bis ca. 2,5 h nach der Markierung an und nähert

sich dann mit zunehmender Verzögerung asymptotisch dem 100 %-Wert der markierten Mitosen. Der Verlauf gleicht in den ersten 2 h demjenigen der Kontrollkultur. Erst später machen sich Unterschiede bemerkbar. So hat die Kontrollkurve der markierten Mitosen nach 2,5 h den 90 %-Wert schon überschritten, während sich die Kurve der chronisch hypoxischen Zellen zu der Zeit erst dem 70 %-Wert nähert. Nach 16 h chronischer Hypoxie ist noch nicht abzusehen, wann die 100 %-Grenze der markierten Mitosen erreicht ist.

Der Wendepunkt der Kurve, der durch die 1. Ableitung bestimmt wurde (vgl. Abb. 25), liegt bei 2 h und stimmt mit dem Mittelwert überein. Bei einer Mitosedauer von 0,6 h beträgt die G_2 -Phasendauer somit 1,7 h. Die Verteilung der Häufigkeit entspricht in ihrem oberen Abschnitt wie bei der Kontrollkurve einer Glockenkurve. Auch hier findet eine asymptotische Annäherung der höheren Werte der G_2 -Phasenlängen an die Abszisse statt. Dieser Prozeß verläuft bei den hypoxischen Zellen jedoch sehr viel langsamer, d.h. die Streuung der G_2 -Phasenlängen hat besonders bei den höheren Werten zugenommen.

3.4 Markierungsindex

3.41 Kontrollen

Der Mittelwert des Markierungsindex von 10 Versuchen beträgt 60,5 % mit einer Standardabweichung von $\pm 5,82$ %. Der Markierungsindex schwankt zwischen ca. 45 % und 75 %. Die Unterschiede von einem Versuch zum anderen ergeben sich, wie schon erwähnt (S.46) aus der Anzahl der Passagen der Serum-charge usw. und nicht direkt kontrollierbaren Einflüssen, wie es z.B. eine

Mykoplasmainfektion sein kann. Diese Parameter tragen zu einer Veränderung der Generationszeit und der Überlebensfähigkeit der Zellen bei.

Bei einem Versuch wurde der Markierungsindex im 2-Stundenintervall über einen Zeitraum von 14 h bestimmt, um festzustellen, ob Temperatur- und pH-Wertschwankungen, die durch das mehrmalige Öffnen des Brutschrankes entstehen, einen Einfluß auf die Größe des Markierungsindex haben.

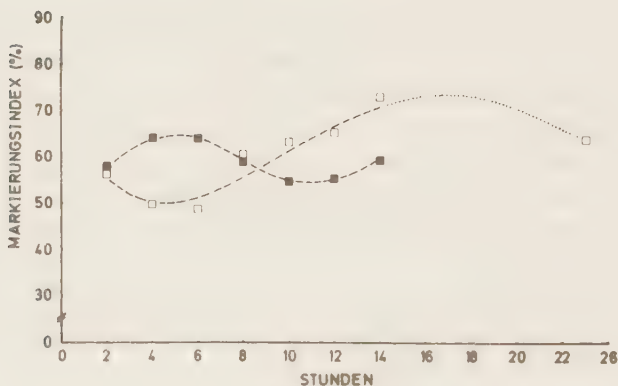


Abb. 27 Das Verhalten des Markierungsindex im Einzelversuch nach Pulsmarkierung und zunehmender Dauer der Inkubation bei Normalbedingungen (■) oder chronischer Hypoxie (□).

Der mittlere Markierungsindex beträgt $59 \pm 3,78\%$ (■) oder $60 \pm 6,4\%$ (□).

Abb. 27 zeigt, daß die maximale Variationsbreite 5 % und die Standardabweichung des Mittelwerts (59 %) $\pm 3,78\%$ beträgt. Es ist folglich stets mit einem

methodisch bedingten Fehler bei der Bestimmung des Markierungsindex zu rechnen. Hinzu kommt noch der Fehler, der bei der Auswertung entsteht und eine Abweichung von etwa $\pm 1,8 \%$ ausmacht.

3.42 Hypoxische Kulturen

Abb. 26 zeigt die Ergebnisse von 11 Versuchen. Es wurde der Markierungsindex über einen Zeitraum von ca. 50 h chronischer Hypoxie gemessen. Die Werte liegen in den ersten 24 h im Bereich des Mittelwertes von 60 % und zeigen eine Standardabweichung von 10,77 %, die etwa doppelt so groß ist im Vergleich zu derjenigen der Einzelversuche.

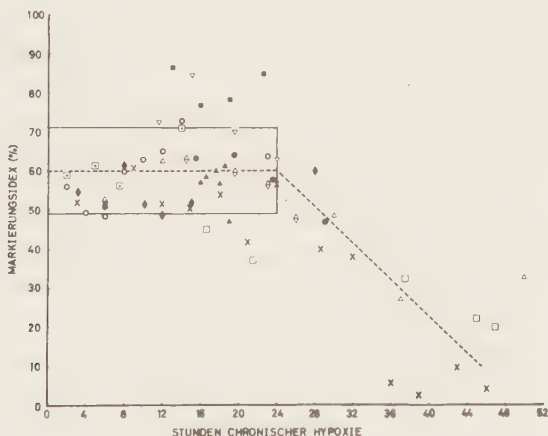


Abb. 26 Das Verhalten des Markierungsindex der Zellen nach Pulsmarkierung und zunehmenden Zeiten chronischer Hypoxie. Es sind die Daten von 11 Versuchen aufgetragen: 1. (o); 2. ($\square$); 3. ($\triangle$); 4. (X); 5. ($\square$); 6. (∇); 7. ($\blacksquare$); 8. ($\blacklozenge$); 9. ($\blacktriangle$); 10. ($\bullet$); 11. ($\blacklozenge$). Der mittlere Markierungsindex beträgt innerhalb der ersten 24 h $60 \pm 10,77 \%$ (eingerahmter Abschnitt).

Die Ergebnisse der Versuche Nr. 2 und Nr. 7 liegen außerhalb der Mittelwertslinie (vgl. Abb. 26) und sind verantwortlich für die Höhe der Standardabweichung. Der kontinuierliche Abfall des Markierungsindex, der nach 24 h chronischer Hypoxie beginnt und nach 48 h 5 - 10 % erreicht, zeigt, daß tiefgreifende Veränderungen in der Zellpopulation stattfinden.

Abb. 27 zeigt den Versuch Nr. 1, der parallel zu dem Kontrollversuch durchgeführt wurde. Der mittlere Markierungsindex beträgt 60 % mit einer Standardabweichung von $\pm 6,4$ %. Wie bei dem Kontrollversuch liegen die Einzelwerte nicht wahllos um den Mittelwert, sondern scheinen einer sinusförmigen Kurve zu folgen. Auch in Abb. 26 liegen die Einzelwerte in den ersten 8 h meist unterhalb des Mittelwertes. Die nächstliegende Erklärung ist die Teilsynchronisation der Zellpopulation durch Temperaturschwankungen, die schon im Einzelversuch (vgl. Abb. 27) aufgefallen ist. Nach Shapiro und Lubennikova (1968) zeigen chin. Hamsterzellen bei Zimmertemperatur einen G_1 -S-Phaseblock. Solange dieser Block anhält, nimmt der Markierungsindex ab, da die Zellen zwar aus der S-Phase auswandern können, aber nicht mehr hineinkommen. Wird der Block aufgehoben, so können die gestauten G_1 -Phasezellen in die S-Phase einwandern, so daß der Markierungsindex wieder ansteigt bis zum und über den normalen Wert. Der Markierungsindex erfährt periodische Schwankungen, die jedoch, wenn es sich um einen kurzfristigen Block handelt, infolge der raschen Desynchronisation nicht länger als eine Generationszeit anhalten. Eine weitere Erklärung für die Veränderung des Markierungsindex kann eine echte Verlängerung der Dauer der S-Phase sein, insbesondere eine Verlangsamung der frühen S-Phase (vgl. S. 97).

3.5 $^3\text{HTdR}$ - Einbaurrate (S - Phasendauer der hypoxischen Zellen)

Tabelle 6:

1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
Vers. Gleichung der		$^3\text{HTdR}$ -	Expos. Steigung	Steigung	Steigung	Steigung	T_S	Steigung x
Nr.	Geraden	Konz.	Zeit	gemess.	kor. auf	kor. auf	(h)	T_S (S.K.)
	(kor. Werte)	($\mu\text{Ci/ml}$)	(h)	(S.K./h)	S-Phase- zellen	$^3\text{HTdR}$ - Konz.		
					(S.K./h)	(S.K./h)		
O_2 :								
1	$y = -21,9 + 79,2x$	0,01	144	46	79,2	79,2	5,06	400
2a	$y = 2,1 + 16,25x$	0,005	53	10,1	16,25	35,84	9,43	338
2b	$y = 9,9 + 17x$	0,005	77	9,57	17,0			
2c	$y = 8,37 + 20,53x$	0,005	100	10,14	20,53			
3	$y = 0,69 + 22x$	0,005	73	15,34	22,0	44,0	8,65	382
4a	$y = 3,51 + 25,3x$	0,005	71	16,6	25,3	50,6	8,57	433
4b	$y = 4,49 + 47,19x$	0,01	71	30,8	47,19	47,19	8,57	404
								391+11
N_2 :								
1	$y = 7,37 + 12,74x$	0,01	210	11,2	12,74	12,74	?	
2	$y = 5,9 + 11,22x$	0,01	192	8,2	11,22	11,22		

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Silberkornmessungen zusammengefaßt. In der 5. Spalte sind die ursprünglich gemessenen Steigungen der Silberkornzahlen (S.K.) aufgeführt, in der 6. Spalte die korrigierten Werte (vgl. S. 25 ff) und in der 7. Spalte stehen die Werte der korrigierten Steigungen, nachdem sie auf eine einheitliche $^3\text{HTdR}$ - Aktivität umgerechnet wurden. Bei den Kontrollen betragen diese letzten Werte im Mittel ca. 51 Silberkörner pro Stunde.

Die 3 verschiedenen Expositionszeiten des Versuches Nr.2 zeigen ungefähr gleiche Ergebnisse, d.h. die Expositionszeit hat, wie schon erwähnt, keinen besonderen Einfluß auf die Zunahme der Silberkornzahl mit der Inkubationsdauer in $^3\text{HTdR}$ (vgl. jedoch S. 142).

Die 8. Spalte führt die Dauer der S-Phasen bei den einzelnen Kontrollversuchen auf (vgl. dazu S. 88). Man erkennt die Beziehung zwischen Dauer der S-Phase und Steigung der Silberkornzahl pro Stunde: Je höher die Steigung, desto kürzer ist in der Regel die Dauer der S-Phase. Das Produkt aus der Steigung und der S-Phasendauer sollte daher bei allen Versuchen einen vergleichbaren Wert ergeben.

Spalte 9 zeigt, daß die mittlere Zahl dieses Produktes 391 Silberkörner mit einer Standardabweichung von ± 11 ergibt. Diese Zahl 391 entspricht der mittleren Silberkornzahl, die man erwartet, wenn die Zellen während ihres Durchganges durch die S-Phase laufend $^3\text{HTdR}$ einbauen konnten, d.h. sie ist proportional zur gesamten synthetisierten DNS - Menge. Die Steigung der Silberkornzahlen / h der hypoxischen Kulturen beträgt im Mittel ca. 12 Silberkörner pro Stunde. Mit dieser Steigung und der Gesamtsilberkornzahl, die pro S-Phase der Kontrollkulturen errechnet wird, erhält man die ungefähre Dauer der S-Phase der chronisch hypoxischen Kultur: $391 : 12 = 32,6 \text{ h.}$

Bei einer mittleren S-Phasendauer der Zellen unter Normalbedingungen von 8,0 h (Mittel der Werte aus der Tabelle 6) handelt es sich um eine Verlängerung der S-Phasendauer der hypoxischen Zellen um den Faktor 4,08 (32,6 : 8).

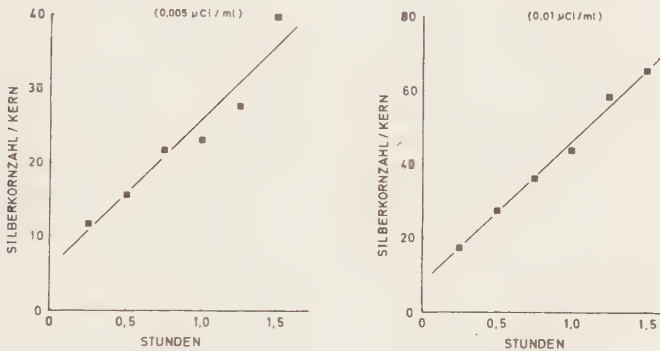


Abb. 28 Zunahme der mittleren Silberkornzahl pro Kern mit der Inkubationsdauer in $^3\text{HTdR}$ bei Normalbedingungen: Die Steigungen der Geraden betragen ca. 25 bzw. 47 Silberkörner pro Stunde ; sie unterscheiden sich um den Faktor 2 etwa. Die Gerade ist durch die korrigierten Werte der Silberkornzählungen gelegt. Einzelheiten vgl. Tabelle 6 (Vers. Nr. 4).

Abb. 28 zeigt ein Beispiel für den Anstieg der Silberkornzahl mit der Inkubationsdauer in $^3\text{HTdR}$. Bis auf die verwendete $^3\text{HTdR}$ -Konzentration sind in diesem Versuch alle Bedingungen gleich. Die korrigierte Steigung beträgt bei einer Konzentration von 0,005 µCi/ml ca. 25 Silberkörner/h und bei einer Konzentration von 0,01 µCi/ml 47 Silberkörner/h, d.h. fast das Doppelte.

Die berechneten Anstiegsgeraden sind durch die korrigierten Werte gelegt.

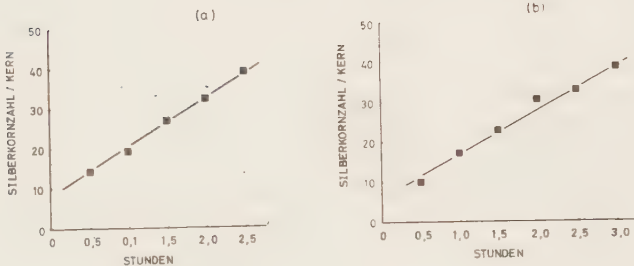


Abb. 29 Zunahme der mittleren Silberkornzahl pro Kern mit der Inkubationsdauer in $^3\text{HTdR}$ ($0,01 \mu\text{Ci/ml}$) nach 14 stündiger Hypoxie. Die Steigungen der Geraden durch die korrigierten Werte der Silberkornzählungen betragen 12,74- (a) und 11,2 Silberkörner pro Stunde (b). Einzelheiten vgl. Tabelle 6.

Der Anstieg der Silberkorndichte beträgt dagegen bei einer $^3\text{HTdR}$ -Konzentration von $0,01 \mu\text{Ci/ml}$ im Mittel nur 11,98 Silberkörner/h (Abb. 29). Zur Korrektur der mittleren Silberkornzahlen wurde eine S-Phasendauer von 30 h verwendet. Die korrigierten Werte der hypoxischen Zellen weichen weniger stark von den ursprünglich bestimmten Werten ab, als die Werte der Kontrollversuche. Je kürzer die angenommene S-Phasendauer der hypoxischen Zellen ist, umso größer würde die Abweichung werden. Bei höheren S-Phasezeiten dagegen würden sich die beiden Werte immer stärker annähern.

Aus den Silberkornverteilungen der einzelnen Präparate nach Dauermarkierung können durch die Verschiebung des Häufigkeitsmaximums mit der Zeit nach Beginn der Markierung ebenfalls Aussagen über die Einbaugeschwindigkeit euoxischer und hypoxischer Zellen erhalten werden. Abb. 30 und 31 zeigen die Silberkornverteilungen der in Abb. 28 gezeigten Steigungen der mittleren Silberkornzahlen von Zellen unter Normalbedingungen.

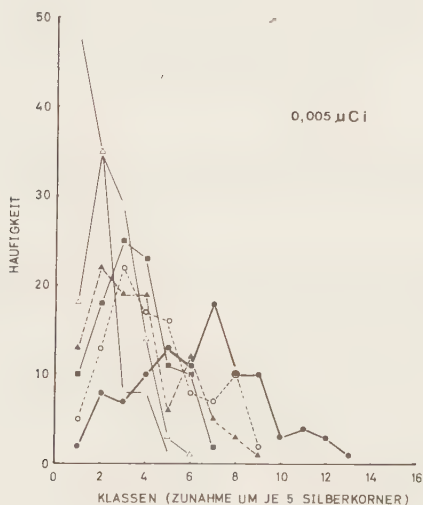


Abb. 30 Silberkornverteilungen der einzelnen Präparate nach Dauerinkubation in HTdR unter Normalbedingungen (Vers. Nr. 4a). Die Ordinate gibt die Häufigkeit der Kerne mit einer bestimmten Silberkornzahl an, und die Abszisse die Zahl der Klassen, in denen die Silberkornzahl um je 5 zunimmt.

□ — 15 min Inkubation
 △ — 30 min " "
 ■ — 45 min " "

▲ — 60 min Inkubation
 ○ — 75 min " "
 ● — 90 min " "

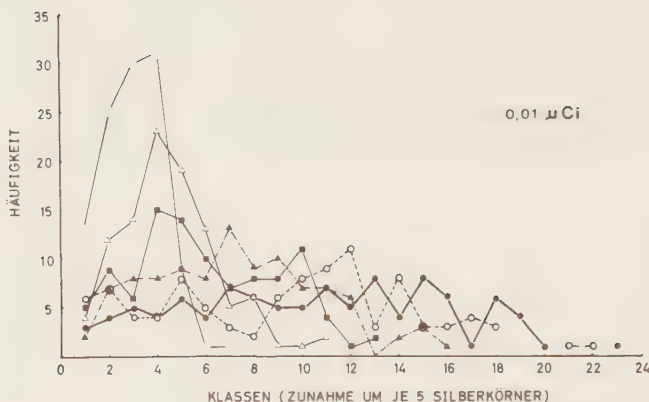


Abb. 31 wie Abb. 30 (Vers. Nr. 4b).

Es wird deutlich, daß bei der höheren $^3\text{HTdR}$ -Konzentration auch die Häufigkeit der Zellen mit hohen Silberkornzahlen schneller ansteigt. Die Verteilungen der einzelnen Präparate zeigen eine zunehmend komplexe Form bei steigender Dauer der Markierung, da laufend Zellen in die S-Phase und aus der S-Phase treten. Dadurch ist die Zahl der Zellkerne mit niedrigen Silberkornzahlen immer höher als zu erwarten ist und fällt in keinem Fall auf den Nullwert in den ersten Klassen ab.

Schon nach einer halben Stunde der Dauermarkierung hat die Silberkornverteilung der Zellen eine große Streuung: 5 - 35 bzw. 5 - 60 Silberkörner/Kern. In der Abb. 31 reicht die Streuung nach 1,5 h schon von 5 - 120 Silberkörnern/Kern.

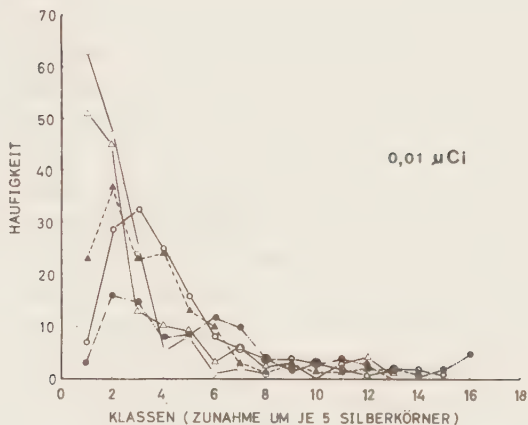


Abb. 32 Silberkornverteilungen der einzelnen Präparate nach Dauerinkubation in 3 HTdR nach 14 h chronischer Hypoxie (Vers. Nr. 1).

- — 0,5 h Inkubation
- △ — 1,0 h "
- ▲ — 1,5 h "
- — 2,0 h "
- — 2,5 h "

In dem Beispiel der hypoxischen Zellen der Abb. 32 reicht die Streuung der Einzelkerne nach 0,5 h Dauermarkierung von 5 - 50 Silberkörner/Kern. Nach 2,5 h reicht sie jedoch nur von 5 - 80 Silberkörner/Kern.

Das Maximum der Häufigkeitsverteilungen, d.h. der größte Anteil der Zellkerne wandert bei den Zellen unter Normalbedingungen (Abb. 31) viel rascher zu den höheren Werten der Silberkornzahl mit der Zeit nach Markierungsbeginn als bei den chronisch hypoxischen Zellen (Abb. 32). Bei den Verteilungen der hypoxischen Zellen befindet sich in dem Bereich der Silberkornklassen, der nach

einer halben Stunde Dauermarkierung erhalten wird, nach 3 h weiterer Markierung immer noch der größte Teil aller ausgewerteten Zellen. Andererseits wird deutlich, daß auch die hypoxische Zellkultur einen gewissen Prozentsatz von hohen und höchsten Silberkornzahlen aufweist, der jedoch im Vergleich zu den Kontrollversuchen niedrig ist.

Die Verteilungen der Silberkornzahlen unter Normalbedingungen auf Abb. 31 zeigen, daß die errechneten korrigierten Silberkornzahlen in etwa mit den Häufigkeitsmaxima der einzelnen Präparate übereinstimmen. Dies steht im Gegensatz zu den hypoxischen Kulturen, deren Maxima viel weiter bei den niedrigen Silberkornklassen liegen; hier beeinflussen also die wenigen Kerne mit extrem hohen Silberkornzahlen den Mittelwert. Die meisten hypoxischen Zellen haben folglich eine geringere $^3\text{HTdR}$ -Einbaurrate als es auf Grund des Mittelwertes der Silberkornzahlen den Anschein hat. Die wenigen Zellen mit hohen Einbauraten könnten normal schnell zyklierende Zellen sein, wenn man eine Veränderung des $^3\text{HTdR}$ -Pools ausschließt.

Unterschiede in der Einbaurrate während der S-Phase können jedoch hiermit nicht gezeigt werden.

3.6 Anstieg des Markierungsindex bei Dauermarkierung (Ableitung aller Zyklusphasen)

3.6.1 Kontrollen

Der Anstieg des Markierungsindex nach Dauermarkierung (vgl. Abb. 33) beruht auf dem Einstrom der G_1 -Phasezellen in die S-Phase. Der 100 %-Wert wird nach Ablauf der G_1 - + G_2 - + M-Phasen erreicht. Die Versuche wurden jedoch nur über einen Zeitraum von 3 - 4 Stunden

durchgeführt, da die Kurve sich später asymptotisch der 100 %-Grenze des Markierungsindex nähert. Mit den einzelnen Werten lassen sich Anstiegsgeraden berechnen, die nach dem Schema 4 (vgl. S.29) die Zykluszeit in die S-Phasendauer und die Zeit der $G_1 + G_2 + M$ -Phasen graphisch einteilen. Rechnerisch lassen sich die 3 Zeiträume unter Verwendung der Steigung der Geraden und des Markierungsindex zu Beginn des Versuches bestimmen. Die Anstiegsgerade wird im Diagramm um den Zeitwert, der zur Pulsmarkierung verwendet wurde, nach links verlegt, um den Nullpunkt und den ersten Wert des Markierungsindex zur Deckung zu bringen. Erst dann stimmt die graphische und rechnerische Bestimmung der Zeiten überein. Der Markierungsindex bei $t=0$ ($LI_{\text{kor.}}$) entspricht dann der Summe aus dem y-Wert der Gleichung bei $x = 0$ und der halben Steigung (halbstündige Intervalle; vgl. Abb. 33 und Tabelle 7a).

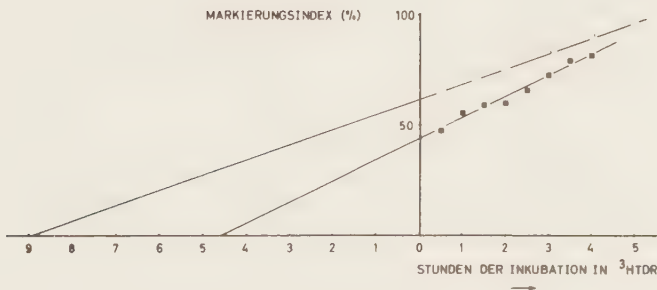


Abb. 33 Anstieg des Markierungsindex nach Dauermarkierung bei Normalbedingungen: Abgebildet sind die Versuche Nr. 1 (■) und Nr. 4 (□) der Tabelle 7a. Die Verlängerung der Geraden auf die Abszisse grenzt die Dauer der S-Phase ab. Die Verlängerung bis zum 100 %-Wert des Markierungsindex gibt die ungefähre Dauer der G_2 -, M- und G_1 -Phasen an. Die Geraden sind hier noch nicht nach links verlegt worden.

Tabelle 7a:

Normalbedingungen

Vers. Nr.	Gleichung der Geraden	Steigung (%/h)	L1 (korr.) (%)	T _C (h)	T _S (h)	T _{G1} (h)
1	y=43,5+9,54x	9,54	48,3	9,44	5,06	2,33
2	y=49,5+5,54x	5,54	52,27	16,25	9,43	4,77
3	y=48,2+5,9x	5,9	51,15	15,25	8,68	4,55
4	y=61,7+6,91x	6,91	65,15	13,05	9,44	1,56
5	y=53,96+6,68x	6,68	57,3	13,45	8,57	2,82
6	y=60,86+8,41x	<u>8,41</u>	<u>65,06</u>	10,82	7,48	1,29
Mittel: y=52,92+7,16x						
		7,16	56,5	12,65	7,9	2,7
		($\pm 1,45$)	($\pm 6,62$)			

Tabelle 7a führt die Daten zu den einzelnen Versuchen auf. Im Mittel hat die Steigung der Geraden einen Wert von $7,16 \pm 1,45$ % markierter Zellen pro Stunde. Zu jedem Versuch wurde mit Hilfe der Steigung die Generationszeit und unter Verwendung des korrigierten Markierungsindex (s.oben), der einen mittleren Wert von $56,5 \pm 6,62$ % besitzt, die S-Phasendauer berechnet.

Zur Berechnung der Generationszeit (T_C) mit Hilfe der Steigung muß diese wegen der unsymmetrischen Lage der S-Phase im Altersdiagramm (vgl. Schema 2a) mit $\lambda = 0,9$ korrigiert werden:

$T_C = 100 : (\text{Steigung} : 0,9) = (0,9 \times 100) : \text{Steigung} \text{ h.}$
Die mittlere Generationszeit beträgt somit:

$$T_C = (0,9 \times 100) : 7,16 = 12,65 \text{ h}$$

Zur Berechnung der S-Phasendauer (T_S) wird die unkorrigierte Steigung verwendet: $T_S = L_1/\text{Steigung}$. Die mittlere S-Phasendauer beträgt somit: $T_S = 56,5 : 7,16 = 7,9$ h. Die mittlere G_1 -Phasendauer errechnet sich aus diesen Daten unter Verwendung der Mitosedauer (0,6 h) und der G_2 -Phasendauer (1,45 h) :

$$T_{G1} = T_{S+G2+M} = 12,65 - (1,45 + 0,6 + 7,9) = 2,7 \text{ h.}$$

Die mittlere G_1 -Phasendauer beträgt 2,7 h.

Wird die Altersverteilung der exponentiell wachsenden Kultur berücksichtigt, so verhalten sich die einzelnen Phasen folgendermaßen zueinander:

$$(G_2+M/2) : S : (G_1+M/2) = 1 : 5,9 : 3,1 = 10\% : 59\% : 31\%.$$

Es wurden dazu die Flächen bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, die zu den einzelnen Phasen im Altersdiagramm (vgl. Schema 2a, S. 14) gehören. Das Verhältnis der S-Phasezellen zu den G_1 -Phasezellen beträgt dabei 2,0: $59\% : (31\% - 1,6\%) = 2,0$, wobei der halbe Mitoseindex von $(G_1+M/2)$ abgezogen wurde.

3.62 Hypoxische Kultur

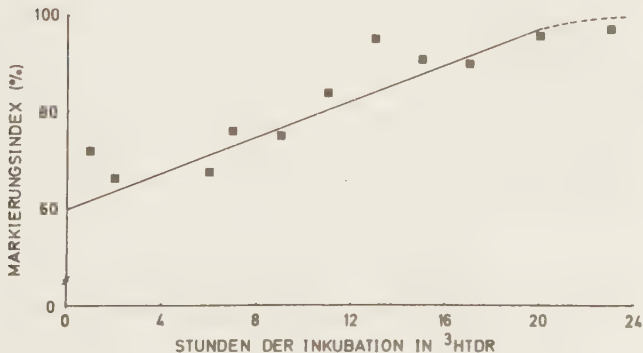


Abb. 34 Anstieg des Markierungsindex nach Dauermarkierung unter chronischer Hypoxie (Vers. Nr. 1).

Tabelle 7b:

Chronische Hypoxie

Vers. Nr.	Gleichung der Geraden	Steigung (%/h)	L1 (korr.) (%)	T _C (h)	T _S (h)	T _{G1} (h)
1	y=59,83+1,86x	1,86	60,72	53,8	32,6	18,5
2	y=41,13+2,62x	2,62	42,44	38,2	16,2	19,3
3	y=70,0+1,29x	1,29	70,65	77,5	54,7	20,1
4	y=61,7+0,88x	0,88	62,14	113,6	70,6	40,3
5	y=66,6+1,2x	1,2	67,2	83,4	56,0	24,7
6 ⁺	y=49,61+1,63x	<u>1,63</u>	<u>50,42</u>	61,4	30,9	27,8
Mittel:	y=58,11+1,58x	1,58 ($\pm$ 0,56)	58,9 ($\pm$ 6,63)	63,3	37,3	23,5

⁺ Der Versuch wurde schon nach 5 Stunden chronischer Hypoxie begonnen.

Der Anstieg des Markierungsindex mit der Dauer der Inkubation in ³HTdR erfolgt bei den chronisch hypoxischen Zellkulturen sehr viel langsamer (vgl. Abb.34). Die mittlere Steigung der in der Tabelle 7b angeführten Versuche beträgt nur 1,58 $\pm$ 0,56 %/h. Die mittlere Generationszeit ist fast um das 5fache verlängert, sie beträgt 63,3 h: T_C = 1 : 1,58 = 63,3 h. Die mittlere S-Phasendauer beträgt 37,3 h und die mittlere G₁-Phasendauer 23,5 h.

Die G₂-Phasendauer und die Mitosedauer unterscheiden sich nicht wesentlich von den Kontrollwerten; beide Zeiten betragen zusammen 2,5 h: 63,3 - (37,3 + 23,5) = 2,5.

Der mittlere korrigierte Markierungsindex unterscheidet sich ebenfalls nicht wesentlich von dem der Kontrollkultur, er beträgt $58,9 \pm 6,63 \%$, d.h. das Verhältnis der Zellen in der S-Phase zu denen in den restlichen Zyklusphasen ist in beiden Fällen etwa gleich.

Es ist anzunehmen, daß sich die hypoxische Zellkultur in einer Art steady-state Wachstum befindet, da bei minimaler Teilungsaktivität keine Zellzunahme festzustellen ist. Die rasche Änderung der Zellflußraten (vgl. S. 97) führen nach 14 h chronischer Hypoxie zu einer Altersverteilung der Zellpopulation, die keine Ähnlichkeit mehr mit derjenigen einer exponentiell wachsenden Zellpopulation hat. Es wurde daher keine Korrektur der mittleren Generationszeit der hypoxischen Kultur vorgenommen.

Im Falle einer exponentiellen Altersverteilung würde sich der Korrekturfaktor dem Wert $\ln 2 = 0,7$ nähern, da sich die S-Phase wegen der im Vergleich zu den anderen Phasen sehr kurzen G_2 -Phasendauer fast direkt an die Mitose anschließt. Die Berechnung von T_C und T_S mit Hilfe der Steigung und des Markierungsindex würde dann eine Generationszeit von $(100 \times 0,7) : 1,58 = 44,3$ h und eine S-Phasendauer von 37,3 h ergeben, d.h. die G_1 -Phasendauer würde nur etwa 5 h betragen. Der Markierungsindex von nur ca. 59% und die impulszytrophotometrischen Untersuchungen (vg. S. 92 ff.) beweisen jedoch den hohen Anteil der G_1 -Phasezellen an der Gesamtpopulation. Das bedeutet, daß nach 14 h Hypoxie eine Verringerung der Zellflußrate nicht nur innerhalb der S-Phase, sondern auch der G_1 -Phase stattgefunden hat. Da bei dem Versuch der Dauermarkierung (Abb. 34) der Markierungsindex bis zum 100%-Wert ansteigt, ist auch der Anteil der zyklierenden Zellen 100%, d.h. die growth - fraction hat noch den Wert 1. Bei einer rechteckig verlaufenden Altersverteilung, wie sie im steady - state Wachstum vorliegt, ist die Zyklusphasenlänge direkt proportional dem Anteil der Zellen in

der Phase. Das prozentuale Verhältnis dieser Anteile wäre dann folgendermaßen:

$$T_{(G1+M/2)} : T_S : T_{(G2+M/2)} = 23,85h : 37,3h : 2,15h, \text{ bzw. } 37,7\% : 59\% : 3,3\%.$$

Das Verhältnis der Anteile der S-Phasezellen zu denjenigen der G_1 -Phase würde dann: $59\% : 37,4\% = 1,59$ betragen. Es ist damit deutlich geringer im Vergleich zu den Zellkulturen bei Normalbedingungen.

Im Gegensatz zur S-Phasebestimmung durch die Ermittlung der $^3\text{HTdR}$ -Einbauraten in die DNS, die eine Verlängerung der S-Phase um den Faktor 4 ergaben, wird bei diesen Versuchen eine mittlere Zunahme der S-Phasendauer um das 4,7 fache gefunden. Wie die Schwankungsbreite der Einzelergebnisse in der Tabelle 7b zeigt, ist der Faktor 4 durchaus innerhalb der erwarteten Abweichungen vom Mittelwert.

Die mittlere Zunahme der G_1 -Phasendauer beträgt das 8,7 fache und ist damit die am stärksten betroffene Zyklusphase.

3.7 Impulszytrophotometer

In den Abb. 35 - 37 sind die Histogramme der Zellkulturen nach zunehmenden Zeiten der chronischen Hypoxie dargestellt. Die Zahl der Impulse pro Messung ist jeweils auf den Abbildungen angegeben. Alle Kurven sind auf gleiche Größe normiert, wobei die Messung stets dann automatisch unterbrochen wurde, wenn eine bestimmte Impulszahl in irgendeinem einzelnen Kanal erreicht wurde. Aus diesem Grund haben alle Kurven einen gleich hohen linken Gipfel.

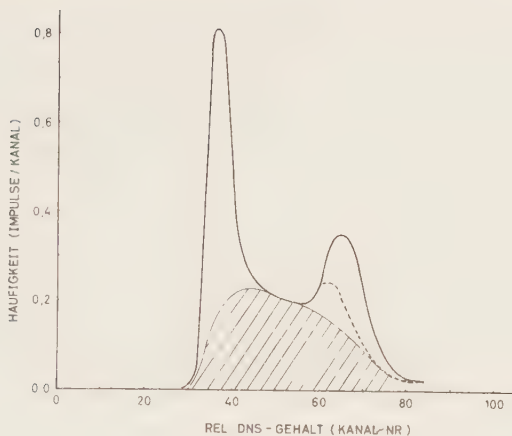


Abb. 35

Verteilung der DNS-Menge einzelner Kerne einer Zellpopulation auf Klassen mit steigendem DNS-Gehalt (= Histogramme) unter Normalbedingungen (—) und nach 15 h chronischer Hypoxie (- - -).

Der linke Gipfel repräsentiert die Verteilung der Zellen mit dem diploiden ($2n$) DNS-Gehalt, d.h. den G_1 - und frühen S-Phasezellen. Der rechte Gipfel stellt die Verteilung der Zellen mit dem tetraploiden ($4n$) DNS-Gehalt dar, d.h. der G_2 -, M- und späten S-Phasezellen. Die schraffierte Fläche stellt die Verteilung der S-Phasezellen dar. (—) 178 000, (- - -) 153 000 Impulse.

Abb. 35 zeigt die beiden übereinandergelegten Verteilungskurven des 1. Versuches, bei dem neben einer Kontrolle zunächst nur eine Messung nach 15 h chronischer Hypoxie durchgeführt wurde. Das Histogramm der unter Normalbedingungen gewachsenen Zellpopulation zeigt zwei ausgeprägte Maxima. Der linke Gipfel, den die G_1 -Phasezellen aufbauen, ist etwa doppelt so hoch wie der zweite Gipfel der Kurve, der sich im wesentlichen aus Zellen mit dem vierfachen DNS-Gehalt, also G_2 -, M- und späten S-Phasezellen zusammensetzt. Die Zellen der S-Phase, die in der

Abb. 35 schraffiert dargestellt sind, weisen einen DNS-Gehalt zwischen $2n$ und $4n$ auf und sind anteilmäßig in beiden Gipfeln enthalten. Sie bilden die überwiegende Fraktion in der Mulde zwischen den Gipfeln. Es bereitet jedoch Schwierigkeiten, allein aus dem Histogramm der Fluoreszenzmessung die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen quantitativ zu erfassen, da der Verlauf der Verteilung der S-Phasezellen nicht feststeht. Sicher ist nur, daß es sich wegen der exponentiellen Zellvermehrung um eine rechtsschiefe Verteilung handelt. Eine gleichzeitige Untersuchung der Zellzyklusparameter mit Hilfe der Autoradiographie z.B. ist daher erforderlich.

Aus den Untersuchungen mit Hilfe der Methode der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung mit $^3\text{HTdR}$ (S.64 ff.) wurden folgende Zykluszeiten erhalten (vgl. Abb.20):

$$T_C = 11,7\text{h}, T_S = 7,5\text{h}, T_{G1} = 2,2\text{h}, T_{G2} = 1,4\text{h}, T_M = 0,6\text{h}.$$

Wird berücksichtigt, daß sich die Kontrollkultur zur Zeit der Messung in exponentieller Wachstumsphase befunden hat, ergibt sich aus den Daten folgende Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen:

$$T_{(G1+M/2)} : T_S : T_{(G2+M/2)} = 28,4\% : 60,3\% : 11,4\%.$$

Werden die 3,3% mitotischen Zellen zur G_2 -Phase gerechnet, wo sie im Histogramm auch zu finden sind, verschiebt sich die Verteilung:

$$T_{G1} : T_S : T_{(G2+M)} = 26,7\% : 60,3\% : 13\%.$$

Auch bei Verwendung der in Tabelle 7a aufgeführten mittleren Zyklusphasezeiten erhält man ähnlich Werte:

$$T_{G1} : T_S : T_{(G2+M)} = 2,7\text{h} : 7,9\text{h} : 2,0\text{h} = 29,4\% : 59\% : 11,6\%.$$

Bei Kenntnis dieser Relation kann das Histogramm so in diese 3 Phasen zerlegt werden, daß die Teilflächen dem berechneten Verhältnis ungefähr entsprechen. Dabei zeigt sich (vgl. Abb. 35), daß der linke und rechte Gipfel des Verteilungsdiagrammes einen sehr hohen Anteil

von S-Phasezellen enthalten. Die Zellen der G_1 -Phase bauen praktisch nur den auf der Verteilung der S-Phasezellen aufsitzenden linken Gipfel auf, während die $G_2 + M$ -Phasezellen den rechten aufsitzenden Gipfel aufbauen. (vgl. Schema 6, S. 41). Die Auszählung der erhaltenen Flächen des Histogrammes der Abb. 35 ergibt einen Anteil der Zellen in der G_1 -Phase von 30,6%, der S-Phase von 55%, der $G_2 + M$ -Phase von 14,4% und entspricht damit weitgehend den oben aufgeführten prozentualen Verhältnissen.

Rechnet man den kleinen rechten Gipfel, der nach 15 h chronischer Hypoxie noch gemessen wurde und ca. 4% ausmacht, zu den S-Phasezellen, so würde die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zyklusphasen noch besser den obigen Beispielen angepaßt sein, jedoch hätte die hypoxische Kultur dann praktisch keine G_2 - und M-Phasezellen. Wie die Markierungsversuche gezeigt hatten, kann es tatsächlich sein, daß der Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation nach länger dauernder Hypoxie auf verschwindend geringe Werte sinkt. Aus der Ungewißheit des Verlaufes der Trennlinie zwischen den G_1 - und G_2 -Phasezellen mit den S-Phasezellen im Histogramm folgt, daß die Berechnung der verschiedenen Zellzyklusphasen aus dem Histogramm nur eine recht grobe Näherung an die tatsächlichen Verhältnisse liefert. Obwohl die Histogramme nur bei Kenntnis bestimmter Zyklusphasen eine quantitative Auswertung erlauben, können jedoch recht genaue Aussagen über relative Veränderungen der Anteile der Zellen in den einzelnen Stadien, wie sie unter andauernder Hypoxie geschehen, gemacht werden.

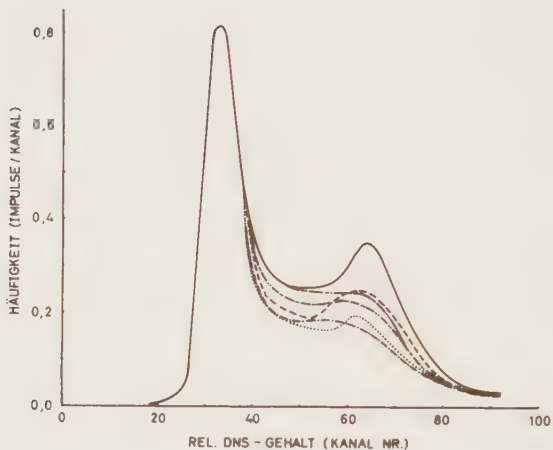


Abb. 36 Übereinandergelegte Histogramme:

(—)	Normalbedingungen (24 000 Impulse)	
(---)	3 h chronische Hypoxie (21 000 Impulse)	
(...)	6 h chronische Hypoxie (19 000 ")	
(-.-)	9 h " " (19 000 ")	
(-.-.-)	12 h " " (22 000 ")	
(-.-.-.-)	14,5 h " " (22 000 ")	

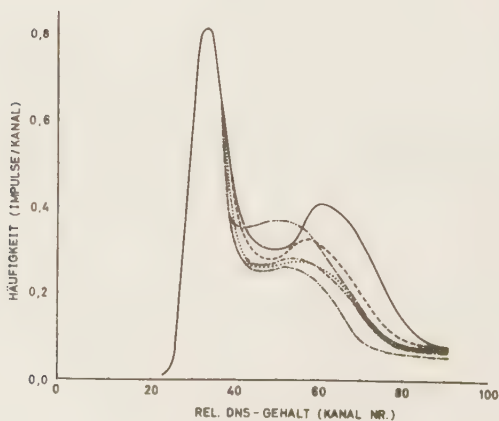


Abb. 37 Übereinandergelegte Histogramme:

(—)	Normalbedingungen	(312 000 Impulse)
(---)	3 h chronischer Hypoxie	(300 000 Impulse)
(...)	6 h	(262 000 ")
(-.-)	9 h	(256 000 ")
(-..-)	12 h	(201 000 ")
(-...-)	30 h	(30 000 ")

Abb. 36 und 37 geben zwei Beispiele für eine derartige Wandlung des Histogrammbildes einer Zellkultur, die zunehmenden Zeiten der Hypoxie ausgesetzt wurde. Wie schon Abb. 35 zeigte, ist in beiden Fällen eine Abnahme des rechten Gipfels zu beobachten. Schon nach 3 h Hypoxie hat er um 1/3 bis 1/4 abgenommen und ist nach 6 h auf Abb. 37 bereits nicht mehr nachweisbar, auf Abb. 36 verschwindend klein. Nach 9 h chronischer Hypoxie tritt der Gipfel auf Abb. 36 ebenfalls nicht mehr auf. Gleichzeitig mit der Abnahme des rechten Gipfels der Kurve wird die Vertiefung der Mulde zwischen den Gipfeln deutlich. Das bedeutet, daß neben einer Abnahme der späten S-, G₂- und M-Phasezellen auch eine generelle Abnahme des Anteils der S-Phasezellen an der Gesamtzellpopulation stattfindet, die auf der Abb. 36 jedoch schon nach 9 h rückläufig ist und nach 14,5 h fast die Höhe der Kontrollkurve wieder erreicht hat. Bei dem Versuch auf der Abb. 37 dauert diese "Welle" etwas länger, denn nach 12 h Hypoxie befindet sich der rechte Kurvenausläufer auf dem niedrigsten Stand, scheint aber ebenfalls später wieder anzusteigen und zeigt nach 30 h chronischer Hypoxie einen relativen Anteil der mittleren S-Phasezellen an der Population, der sogar über dem Wert der Kontrollkurve liegt. Der Anteil der G₂- und M-Phasezellen an der Population bleibt jedoch auch nach 30 h chronischer Hypoxie sehr gering, da kein Wiederaufbau der rechten Flanke des rechten Kurvenabschnitts stattfindet.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter Normalbedingungen weisen die chin. Hamsterfibroblasten innerhalb der ersten drei Tage nach der Aussaat eine exponentielle Zellvermehrung auf mit einer Verdopplungszeit von 11 - 18 h, je nachdem ob die Zellen in Glas- oder Plastikgefäßen gezüchtet wurden. Auf Glas gezüchtete Zellen haben eine mittlere Verdopplungszeit von ca. 13 h. Die Verdopplungszeit unter optimalen Bedingungen beträgt 11 - 12 h. Diese Werte stimmen mit der autoradiographisch bestimmten mittleren Generationszeit der Zellen überein.

Ca. 86,5 $\pm$ 13 % der Zellen sind unter Normalbedingungen unbegrenzt teilungsfähig und können Kolonien bilden.

Der Mitoseindex beträgt 3,3 % $\pm$ 0,5 %. Bei einer Generationszeit von 13 h errechnet sich aus der Beziehung $T_M = T_C \times MI/100 \times \ln 2$ eine Mitosedauer von 0,62 h oder 37 min. Dieser Wert stimmt mit den Ergebnissen der Colcemid-Versuche überein.

Aus dem Anstieg des Prozentsatzes markierter Mitosen nach Pulsmarkierung ergibt sich eine mittlere G_2 -Phasendauer von 1,36 h mit einem Häufigkeitsmaximum bei 1,45 h.

Bei einem mittleren Markierungsindex von 60,5 % und einer mittleren Generationszeit von 12,65 h errechnet sich aus der Beziehung $T_S = T_C \times LI / 100 \times 0,9$ eine S-Phasendauer von 8,5 h. Ein Beispiel einer Kurve der markierten Mitosen zeigte bei einem Markierungsindex von 65 % und einer Generationszeit von 11,7 h eine S-Phasendauer von 7,5 h. Die Versuche der Dauermarkierung ergaben bei einem mittleren Markierungsindex von 56,5 % und einer mittleren Generationszeit von 12,65 h eine S-Phasendauer von 7,9 h. Die Messung des $^3\text{HTdR}$ -Einbaus nach Dauermarkierung durch Silberkornzählung pro Kern

ergab eine mittlere Steigung von ca. 51 Silberkörnern pro Stunde und eine theoretische Silberkornzahl pro S-Phase von 391 ± 11 .

Bei einer Generationszeit von 12,65 h und einer S-Phasendauer von 7,9 h, einer G_2 -Phasendauer von 1,45 h und einer Mitosedauer von 0,6 h errechnet sich eine mittlere Länge der G_1 -Phase von 2,7 h.

Der prozentuale Anteil der Zellen an den einzelnen Zyklusphasen beträgt:

$T_{G1} : T_S : T_{G2} : T_M = 29,35\% : 59\% : 8,35\% : 3,3\%$ (Versuche der Dauermarkierung) bzw. $30,6\% : 55\% : 11,1\% : 3,3\%$ (Impulszytophotometrische Untersuchungen).

Nach Beginn der hypoxischen Bedingungen flacht die Wachstumskurve der Zellen rasch ab, mündet spätestens nach 12 h in ein Plateau und beginnt nach 60h chronischer Hypoxie abzufallen.

Bei zunehmender Dauer der Hypoxie nimmt der Anteil der Zellen mit der Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung nach einer exponentiellen Dosiswirkungsbeziehung ab. In den ersten 2 h beträgt die Anzahl der klonogenen Zellen noch etwa 90 - 100%, nach 6 - 8 h nur noch ca. 50%, nach 24 h ca. 25% und nach 48 h ca. 13%.

Der Mitoseindex der Zellen fällt sofort exponentiell ab. Nach 2 h Hypoxie sinkt der Mitoseindex auf ca. 2,1% ab, nach 4 h Hypoxie auf 1,2%, nach 6 h auf 0,6% und nach 8 h auf etwa 0,45%. In der folgenden Zeit ändert sich dieser Wert mit der Dauer der Hypoxie nicht mehr.

Die Mitosedauer der hypoxischen Zellkultur, die sich mit Hilfe des Anstiegs des Mitoseindex nach Colcemid-einwirkung bestimmen läßt, beträgt 0,7 - 1 h und hat

sich im Vergleich zur Mitosedauer der unter Normalbedingungen wachsenden Zellen (0,62 h) nur unwesentlich verlängert.

Die mit Hilfe der Kurven der markierten Mitosen nach Puls- und Dauermarkierung bestimmte G_2 -Phasendauer beträgt nach 14 stündiger Hypoxie im Mittel 1,7 h; das entspricht einer geringen Veränderung um 17,2 % des Normalwertes (1,45 h).

Der Markierungsindex der chronisch hypoxischen Zellkultur zeigt innerhalb der ersten 24 h keine großen Abweichungen von den Kontrollkulturen, er beträgt 60 %. Später setzt jedoch eine stete Abnahme des Markierungsindex ein. Nach 36 h Hypoxie beträgt er ca. 30 %, nach 48 h nur noch 15 %.

Die Dauer der S-Phase wurde durch Messung der Einbaurates von $^3\text{HTdR}$ in die DNS mittels 3H-Autoradiographie bestimmt. Die mittlere Einbaurates der unter Normalbedingungen gewachsenen Zellen beträgt ca. 51 Silberkörner/h Inkubationsdauer. Bei einer mittleren S-Phasendauer von 8 h in denselben Versuchen erhält man eine maximale Silberkornzahl der S-Phasezellen bei Dauermarkierung ($T_{\text{Mark.}} \geq T_S$) von ca. 391, die von den Zellen nach 14 stündiger Hypoxie bei einer mittleren Einbaurates von ca. 12 Silberkörnern/h erst nach ca. 33 h S-Phasendauer erreicht wird. Nach 14 stündiger Hypoxie wurde mit dieser Methode eine Verlängerung der S-Phasendauer um über das 4 fache gefunden. Die Bestimmung der S-Phasendauer mit Hilfe des Anstiegs des Markierungsindex nach Dauermarkierung ergab eine Verlängerung um das 4,7 fache. Die mittlere S-Phasendauer betrug 37,3 h.

Nach 14 stündiger Hypoxie wurde eine Verlangsamung des Anstiegs des Markierungsindex bei Dauermarkierung von

7,16 auf 1,58 %/h, d.h um das 4,5 fache festgestellt. Diese Verlangsamung betrifft die S-Phase und die G_1 -Phase gleichermaßen. Die Zellzyklusphasen betragen im Mittel: $T_C = 63,3$ h; $T_S = 37,3$ h; $T_{G_1} = 23,5$ h; $T_{G_2+M} = 2,5$ h. Dies entspricht einer prozentualen Verteilung von : $T_{G_1+M/2} : T_S : T_{G_2+M/2} = 37,7 \% : 59 \% : 3,3 \%$.

Die G_1 -Phase der Zellen nach 14 stündiger Hypoxie hat sich mit 23,5 h Dauer um das 8,7 fache verlängert und ist damit diejenige Zyklusphase, die zu dem untersuchten Zeitpunkt am stärksten verlängert ist.

Mit Hilfe des Impulszytrophotometers wurde die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen nach zunehmenden Zeiten der Hypoxie gemessen. Ausgegangen wurde von der prozentualen Verteilung der unter Normalbedingungen gewachsenen Zellen, die bei den autoradiographischen Untersuchungen gefunden ($T_{G_1} \sim 28\%$, $T_S \sim 60\%$, $T_{G_2+M} \sim 12\%$) und auf die Histogramme der DNS-Verteilung übertragen wurde. Bei zunehmender Dauer der Hypoxie vermindert sich der Gipfel des Histogramms, der sich aus späten S-Phasezellen und den G_2 - und M-Phasezellen zusammensetzt. Nach 6 - 9 h Hypoxie ist er verschwunden, d.h. der Anteil der G_2 - und M-Phasezellen an der Population hat sich stark vermindert. Auch der Anteil aller S-Phasezellen verringert sich in den ersten 9 h der chronischen Hypoxie, er erreicht jedoch nach rund 14 h wieder den ursprünglichen Wert.

Es findet also sehr rasch eine Anreicherung von Zellen in der G_1 - und der S-Phase statt, wobei durch den ungehinderten Einstrom aus der G_2 - und der M-Phase die G_1 -Phase vorübergehend eine stärkere Anreicherung erfährt als die S-Phase.

IV Diskussion

1. Proliferation hypoxischer Zellen

Im folgenden wird eine Übersicht über die Ergebnisse einzelner Autoren bezüglich der Wachstumsaktivität verschiedener Säugetierzellen in vitro unter sauerstoffarmen Bedingungen gebracht. Im Anschluß daran folgt die Diskussion der widersprüchlichen Ergebnisse anhand der verwendeten Methoden zur Herstellung der hypoxischen oder anoxischen Bedingungen.

1.1 Literaturübersicht

Seit Schwarz (1909), Holthusen (1921), Mottram (1936) u.a. die Abhängigkeit der Strahlenwirkung von dem O_2 -Partialdruck beobachteten, und seit Warburg (1956) seine These über die Entstehung des malignen Zellwachstums durch die Schädigung der Zellatmung infolge O_2 -Mangels veröffentlichte, wurde dem Wachstumsverhalten von Säugetierzellen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration des umgebenden Milieus zunehmende Aufmerksamkeit geschenkt. Es wurde dabei der Einfluß vor allem der hypoxischen und der anoxischen Bedingungen auf den Kohlehydratstoffwechsel und die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht.

Kurzzeitige Exposition bei O_2 -armen oder O_2 -freien Bedingungen und Kultivierung bei O_2 -Konzentrationen $\geq 1\%$ ergaben keine wesentlichen Änderungen in der Zellvermehrungsrate (Goldblatt und Cameron 1953, Sanford u. Parshad 1968).

Unter chronischer Hypoxie oder Anoxie wurde von den einzelnen Autoren ungehemmte, leicht veränderte oder

stark gehemmte Zellproliferation gefunden.

So fanden Harris (1956) bei Primärkulturen von Rattenherzen sowie Shaw und Pace (1969) bei Mäusefibroblasten unter, wie sie annahmen, O_2 -freien Bedingungen ungehemmtes Wachstum. Bei Jones und Bonting (1956) trat bei embryonalen Hühnerfibroblasten erst nach 8 Tagen ungehemmter Zellvermehrung eine Wachstums-
hemmung ein. Mottram (1927) beobachtete beim Jensen-Rattensarkom eine graduelle Verringerung der Zellvermehrung.

Dagegen fanden Laser (1933) bei Hühnerosteoblasten, Hudspeth u. a. (1950) bei embryonalen Hühnerrückenmarkszellen, Rueckert und Muller (1960) bei Hela-Zellen, Dales (1960) bei L-Zellen und embryonalen Mäusezellen, Rutter (1960), Brosemer und Rutter (1961) an Hela-Zellen, Pace u.a. (1962) bei L-Zellen, Mäuseleber- und Hela-Zellen sowie Gifford (1962) bei Hela-Zellen eine von vornherein mehr oder weniger stark verringerte Zellvermehrung unter O_2 -armen Bedingungen. Gifford (1962) fand, daß die Zellen nach kurzem Wachstum in der Anoxie absterben. Medawar (1947) konnte an Rattenhautexplantaten das Überleben des Gewebes über eine Woche lang unter absolut O_2 -freien Bedingungen feststellen; es war jedoch keine Zellvermehrung oder mitotitische Aktivität zu beobachten.

Clark (1964a) wies bei Fibroblasten und Sarkomzellen der Maus einen reversiblen Wachstumsstop unter anaeroben Bedingungen nach.

Graff und McCarty (1957) zeigten, daß keine Zell-
auswanderung aus Explantaten bei hypoxischen Bedingungen stattfindet.

Littbrand und Révész (1968) beobachteten eine Verlangsamung des Kolonienwachstums chin. Hamsterzellen.

Ebenso fanden Bedford (1970) an tetraploiden chin. Hamsterzellen sowie Koch u.a. (1973a) an chin. Hamsterzellen eine Verringerung oder Einstellung der Zellvermehrung. Koch u.a. (1973c) fanden ein fast ungehemmtes Wachstum der chin. Hamsterzellen bei Sauerstoffkonzentrationen von $\geq 0,5 \mu\text{M/l}$. Unterhalb dieser Konzentration nimmt die Zellzahl nur noch für kurze Zeit zu und bleibt dann konstant. Es wurde die Zellzahl pro Kulturflasche nach zunehmenden Zeiten der Hypoxie gemessen.

1.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse und derjenigen der Literatur im Hinblick auf die verschiedenen Methoden zur Herstellung der chronischen Hypoxie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen den Schluß nahe, daß nach einer bestimmten Inkubationsdauer unter streng hypoxischen Bedingungen keine Zellvermehrung mehr stattfindet; im Gegensatz zu den exponentiell steigenden Wachstumskurven der unter Normalbedingungen gewachsenen Zellen münden die Wachstumskurven bei hypoxischen Bedingungen in ein Plateau. Die unterschiedlichen Ergebnisse der oben genannten Autoren erklären sich einmal aus der Verwendung unterschiedlichen Versuchsmaterials. Vor allem aber erklären sie sich aus der Anwendung zum Teil unzulänglicher Methoden zur Herstellung der hypoxischen Bedingungen.

Es ist bekannt, daß embryonale Zellen, Krebszellen oder Fibroblasten eine höhere aerobe Glykolyse aufweisen als z.B. Leberzellen, die daher vermutlich eher durch die Hypoxie geschädigt werden (Stevens 1965). Entgegen der Ansicht Warburgs (1956) können nach den

neueren Untersuchungen auch Zellen mit einer hohen aeroben Glykolyse unter anoxischen Bedingungen auf die Dauer nicht überleben oder sich vermehren, obwohl das durch die Anaerobiose verursachte Energie-defizit durch stark erhöhte Glykolyse zum grossen Teil ausgeglichen wird, wie der angestiegene Glukoseverbrauch und die vermehrte Milchsäurebildung bei zahlreichen Untersuchungen gezeigt haben.

Sauerstoffkonzentrationen, die den Zellen eine gewisse Atmungsaktivität erlauben - die halbmaximale Atmungsaktivität beträgt nach Froese (1962) bei Ehrlich-Ascites Tumorzellen $0,26 \mu\text{M}/1$ ($0,034\%$) O_2 bei 37°C -, ermöglichen für gewisse Zeit das Überleben und Vermehren. Es ist daher verständlich, daß bei O_2 -Konzentrationen unter 1% noch volle Atmungsaktivität und damit Vermehrungsfähigkeit der Zellen vorliegt (vgl. dazu Abb.38). Es kommt daher darauf an, sehr niedrige und schwer meßbare O_2 -Konzentrationen zu erreichen und zu kontrollieren. Die Methode zur Erzielung und Aufrechterhaltung chronisch hypoxischer oder anoxischer Bedingungen kann daher entscheidend sein für den Verlauf der Wachstumsuntersuchungen.

Harris (1956) und Shaw (1969) begasten ihre Zellkulturen kurzzeitig mit N_2 -Gas, dem ca. 4% CO_2 beigemischt war und verschlossen anschließend die Kulturflaschen luftdicht. Die O_2 -Messung von Harris zeigte dabei noch über $2 \mu\text{M}/1$ O_2 ; auch Shaw vermutete einen Restbestand von O_2 im Medium. Beide Autoren nahmen an, daß durch die Zellatmung bald anoxische Verhältnisse erreicht werden. Mediumwechsel und die Verwendung von Plastikkulturflaschen ergänzen jedoch den O_2 -Gehalt des Mediums. Es zeigte sich, daß Plastikgefäße

in hohem Maße O_2 in ihren Wandungen speichern können, das durch langsames Herausdiffundieren ins Medium gelangt. (Chapman u.a. 1968, Davies und Baker 1970, Born und Hug 1970). Unter sonst gleichen Begasungsbedingungen wurde von uns eine nahezu unveränderte Vermehrungsaktivität bei Zellen, die in Plastikflaschen kultiviert wurden, gefunden, während in Glasflaschen gezüchtete Zellen keine Zellvermehrung zeigten.

Gewebeexplantate weisen im Gegensatz zu permanenten Zellstämmen schon bei 1 - 2 % O_2 im Medium Wachstumsstörungen auf (Mottram 1927, Wind 1926), wobei u.U. technische Schwierigkeiten der Kultivierung eine Rolle spielten.

In den meisten Fällen wurde zur Herstellung der hypoxischen Bedingungen durch die Kulturflaschen für Sekunden oder Minuten mit einer hohen Durchflußrate über das Medium hinweg oder durch das Medium CO_2 -haltiges N_2 -Gas geschickt und die Kulturflaschen bis zur Verwendung verschlossen gehalten. Offensichtlich wurde die O_2 -Konzentration des Mediums auf diese Weise soweit verdünnt, daß innerhalb der folgenden Tage Wachstumsstörungen durch O_2 -Mangel auftraten. Sofern kein O_2 in das Medium nachdiffundieren kann - aus der Plastikwand des Kulturgefäßes, durch undichte Verschlüsse oder durch Gummistopfen, Membranen usw. - wird durch die Zellatmung, die nach Harris (1956) bei Herzfibroblasten $2,4 \times 10^{-9} \mu M O_2$ pro Zelle und Sekunde, nach Boag (1969) bei Ehrlich-Ascites Tumorzellen $2,5 \times 10^{-11} \mu M O_2$ pro Zelle und Sekunde beträgt, je nach Zelldichte mehr oder weniger schnell das restliche O_2 verbraucht. Dieser Prozeß begrenzt sich selbst, da nach Froese (1962)

die Zellatmung bei abnehmender O_2 -Konzentration ab ~ 4 $\mu M/l$ exponentiell abnimmt (Abb. 38, Kurve 1).

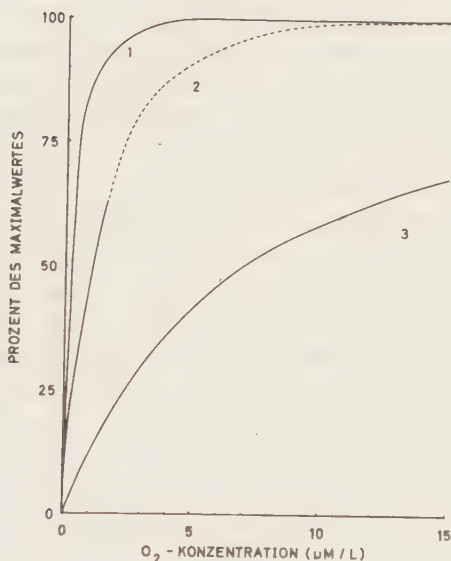


Abb. 38 Die Abhängigkeit des O_2 -Verbrauches (1), der Verdopplungszeit (2) und der relativen Strahlenempfindlichkeit (3) der Zellen vom O_2 -Partialdruck im Zellmilieu.

- 1) Die Atmungsaktivität der Zellen steigt innerhalb von $0-4 \mu M/l$ O_2 bis auf den Maximalwert an. Der halbmaximale O_2 -Verbrauch findet bei einer O_2 -Konzentration von $0,26 \mu M/l$ ($37^\circ C$) statt (Froese 1962 an Ascites-Tumorzellen).
- 2) Der reziproke Wert der Verdopplungszeit, in Prozenten des Normalwertes angegeben, erreicht den halbmaximalen Wert bei einer O_2 -Konzentration von etwa $1,0 \mu M/l$. Die normale Verdopplungszeit wird vermutlich erst bei einer O_2 -Konzentration von etwa $15 \mu M/l$ auftreten (gestrichelter Teil der Kurve; der durchgezogene Kurventeil beruht auf Daten von Bedford 1969 an chin. Hamsterzellen).

- 3) Der halbmaximale Sauerstoffeffekt tritt bei einer O_2 -Konzentration von $7 \mu M/l$ auf. Die Kurve ist nach der Gleichung von Howard-Flanders und Alper (1957) berechnet unter Verwendung eines K-Wertes von $7 \mu M/l$ und eines Wertes für den maximalen Sauerstoffeffekt von 3.

Je nach der O_2 -Konzentration des Mediums wird die Zellvermehrung mehr oder weniger stark beeinträchtigt, wie die unterschiedliche Neigung der Wachstumskurven zeigt (Bedford 1970). Erst bei einer O_2 -Konzentration von $0,07 \mu M/l$ im Gasstrom zeigen die Kulturen keine Zellzunahme mehr (Bedford 1970).

Zur Herstellung anoxischer Bedingungen ist es notwendig, absolut luftdichte Kulturgefäße und O_2 -freies Gas zu verwenden oder die Kulturflaschen kontinuierlich mit einem absolut O_2 -freien Gas zu durchströmen (Clark 1964b). Besonders bei kurzzeitiger Begasung, die bei Bestrahlungsversuchen zweckmäßig ist, spielt die Dauer der Begasung, die Art des Kulturgefäßes und vor allem die Mediumhöhe über den Zellen eine entscheidende Rolle für den Hypoxiegrad (Baker und Town 1966, Michael, Scott und Révész 1966, Chapman u.a. 1968, Moore und Smith 1970).

Wegen der Gefahr der Austrocknung (Belli und Roach 1968) muß bei Wachstumsversuchen jedoch genügend Medium in den Kulturflaschen vorhanden sein.

Ersatz des O_2 -reichen Mediums durch vorbegegastes, O_2 -armes Medium (Littbrand und Révész 1968) und anschließende Dauerbegasung sowie Dauerbegasung ohne Mediumwechsel (Bedford 1970) schaffen - ebenso wie die häufig angewandte Methode, die Kulturgefäße in einen Behälter zu bringen, der mehrmals evakuiert, mit CO_2 -haltigem N_2 -Gas aufgefüllt und abgeschlossen wird (u.a. Koch und Kruuv 1971) - auch für Wachstumsversuche von Anfang an streng hypoxische oder anoxische Bedingungen.

In Plastikgefäßen wurden noch nach Stunden der Begasung einige $\mu\text{M O}_2/\text{l}$ im Medium gemessen. Je höher die Mediumsschicht war, umso langsamer nahm die O_2 -Konzentration im Medium ab, wobei das Gleichgewicht nicht erreicht werden konnte. In der Gasphase allerdings wurde schon nach 1 h Begasung nur noch eine O_2 -Konzentration von $0,08 \mu\text{M}/\text{l}$ gemessen.

Wie die Arbeit von Baker und Town (1966) demonstriert, ist also die Messung des O_2 -Gehaltes des ausströmenden Gases kein zuverlässiges Mittel zur Bestimmung der O_2 -Konzentration des Mediums während der Begasung. Koch und Kruuv (1971/72) haben mit einer besonderen Meßmethode eine exponentielle Abnahme der O_2 -Konzentration im Medium sowohl nach mehrmaligem Evakuieren der Kammer, in der sich die Kulturgefäße befanden, als auch bei Dauerbegasung nachgewiesen. Die Herstellung des Gleichgewichts zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase dauert bei der Dauerbegasung kaum länger.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Dauerbegasung durch Anschluß der Kulturflasche an einen radial-symmetrischen Gasverteiler umgeht weitgehend das Problem der ungleichmäßigen Begasung, das bei der Hintereinanderschaltung der Flaschen anfänglich noch auftritt (u.a. Bedford 1970).

Ein indirekter Weg zur Messung des O_2 -Partialdruckes in der unmittelbaren Zellnähe ist die Bestimmung der Endneigung von Dosiseffektkurven nach Bestrahlung der Zellkulturen mit ionisierenden Strahlen bei verschiedenen O_2 -Konzentrationen.

Wie schon in der Einleitung geschildert, ist die Überlebensrate der Zellen nach Bestrahlung, gemessen an der Koloniebildungsfähigkeit umso geringer je größer die O_2 -Konzentration im Medium ist.

Die Endneigung der im halblogarithmischen Diagramm bei hohen Dosen linear verlaufenden Dosiseffektkurve wird mit zunehmender O_2 -Konzentration immer steiler. Das Maß dieser Neigung, die sog. D_0 , d.h. die Dosis, die die Überlebensrate der Zellen um den Faktor $1/e$ reduziert, wird immer kleiner. Es zeigte sich, daß der Faktor, um den sich die Wirkung einer bestimmten Dosis erhöht, bei einer O_2 -Konzentration von $230 \mu M/l$ (ca. 20% O_2) den maximalen Wert von 3 erreicht hat (vgl. Abb. 38, Kurve 3). Dieser dosismodifizierende Faktor errechnet sich aus dem Verhältnis der D_0 von Dosiseffektkurven, die nach Bestrahlung von Zellkulturen bei den verschiedenen O_2 -Konzentrationen erhalten wurden.

Von Alper und Howard-Flanders (1956) wurde erstmals der sog. K-Wert, d.h. die O_2 -Konzentration für den halbmaximalen O_2 -Effekt, bei Bakterien ermittelt, der mit 7,2 bis $4,0 \mu M/l$ (Howard-Flanders und Alper 1957) in etwa mit den Ergebnissen bei Säugetieren übereinstimmt. So fand Dewey (1960) einen K-Wert von 8,5, Barendsen (1961) von 7,1 und Elkind u.a. (1965) von $8,0 \mu M/l$. Deschner und Gray (1959) sowie Alper (1960) berichten über K-Werte von $4,0 \mu M/l$.

Eigene strahlenbiologische Untersuchungen zeigten, daß bei einer Durchflußrate von 16 l/h des N_2-CO_2 -Gasgemisches (jede der 18 Flaschen tauscht dabei rd. 5 mal pro Stunde ihr Gasvolumen aus) nach spätestens 5 h der maximale O_2 -Effekt auftritt (Abb. 1). Die O_2 -Konzentration ist also innerhalb dieser Zeit wesentlich unter $8 \mu M/l$ abgesunken. Bei exponentieller Abnahme der O_2 -Konzentration im Gasraum (Abb. 39) sinkt der O_2 -Gehalt im Medium nach 5 stündiger Begasung auf $< 1 \mu M/l$, evtl. $0,2 \mu M/l$ (vgl. dazu

im folgenden) und würde damit schon in dem Bereich der halbmaximalen Atmungsaktivität liegen, die von Froese (1962) bei Ehrlich Ascites Tumorzellen bei 0,26 $\mu\text{M}/1$ beobachtet wurde (vgl. Abb. 38, Kurve 1). Anoxische Bedingungen, die keine Zellatmung mehr zulassen, wurden nicht erreicht, da kurze Verbindungselemente aus Silikonschläuchen verwendet wurden, die O_2 -durchlässig sind.

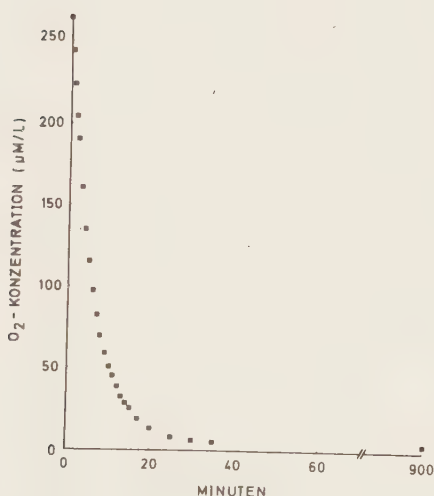


Abb. 39 Abnahme der O_2 -Konzentration in der Gasphase. Es erfolgt ein exponentieller Abfall der O_2 -Konzentration mit der Dauer der Begasung (95 % N_2 +5 % CO_2) der Kulturf flasche bis auf 5 $\mu\text{M}/1$ O_2 innerhalb einer halben Stunde.

Nach Littbrand und Révész (1969) können Zellen, die noch eine geringe Atmungsaktivität besitzen, einen bestimmten kleinen Strahlenschaden, den sog. subletalen Strahlenschaden, reparieren. Bei höheren Dosen wird der Anteil der Zellen mit geringen Schäden zu klein, um die Überlebensrate merklich zu verbessern. Unter fast völlig O_2 -freien Bedingungen (unter $0,002 \mu M/l$), also wenn keine Zellatmung mehr möglich ist, findet nach Littbrand und Révész (1969) auch keine Erholung vom subletalen Strahlenschaden mehr statt - die Dosiseffektkurve folgt einer reinen e-Funktion. Da die Dosiseffektkurve der hypoxischen Zellen auf Abb. 1 keine reine e-Funktion darstellt, müßten die Zellen noch eine gewisse Atmungsaktivität aufgewiesen haben. Der Beweis für die Erholung der Zellen von einem subletalen Strahlenschaden kann jedoch erst bei einer zweiten Bestrahlung erbracht werden, wo gezeigt werden kann, daß vorbestrahlte Zellen nach einem Zeitintervall auf geringe Strahlendosen reagieren wie nicht vorbestrahlte Zellen. Wenn die Erholungsfähigkeit der Zellen direkt von der Atmungsaktivität der Zellen abhängt, so muß sie genau der Kurve 1 der Abb. 38 folgen. Kurve 2 der Abb. 38 zeigt die reziproke Abhängigkeit der Zellverdopplungszeit von der O_2 -Konzentration des Zellmilieus. Der ausgezogene Teil der Kurve wurde nach Daten von Bedford (1969) aufgetragen; der gestrichelte Kurventeil stellt den mutmaßlichen Verlauf der genannten Abhängigkeit dar. Danach tritt der halbmaximale O_2 -Effekt bezüglich der Zellverdopplungszeit bei einer O_2 -Konzentration von ca. $1,1 \mu M/l$ auf und liegt somit zwischen dem halbmaximalen O_2 -Effekt bezüglich der Überlebensrate nach Bestrahlung und der Zellatmung. Der Wachstumsstop

der hypoxischen Zellen bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit, der schon nach wenigen Stunden eintrat, ist ein Hinweis darauf, daß die O_2 -Konzentration im Medium weit unter $1 \mu M/l$ liegen muß.

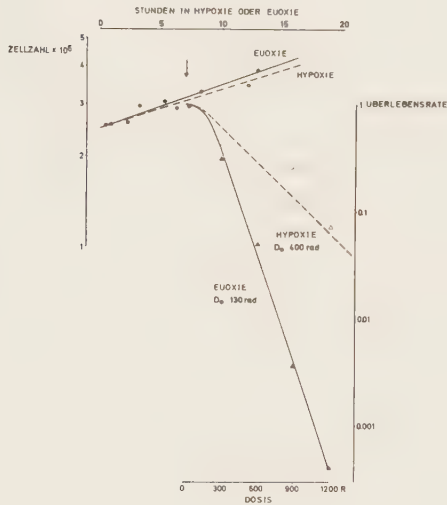


Abb. 40 Die Zellen sind 48 h nach der Zellaussaat in Plastikflaschen entweder weiterhin in Euoxie oder aber in Hypoxie kultiviert worden. Die oberen beiden Kurven zeigen den vergleichbaren Anstieg der Zellzahl pro Kulturflasche mit der Dauer der Kultivierung in Hypoxie (O) oder Euoxie (●). 7 Stunden nach Beginn der hypoxischen Bedingungen wurden von den hypoxischen (Δ) und euoxischen ($\blacktriangle$) Zellen die Überlebensrate nach verschiedenen Röntgendosen gemessen. Die Dosis-effekt-kurven haben eine D_{50} von 130 R (Euoxie) und 400 R (Hypoxie). Der dosismodifizierende Faktor beträgt: $400 : 130 = 3,1$.

Abb. 40 zeigt noch einmal ein Beispiel der praktisch ungestörten Zellvermehrung in Plastikflaschen unter euoxischen und hypoxischen Bedingungen (obere Kurven: Ordinate links, Abszisse oben). Es wurden von diesen euoxischen und 7 h hypoxischen Zellen Dosiseffekt-kurven erhalten, die einen Unterschied in der Endneigung von ca. 3 aufweisen, d.h. den maximalen O_2 -Effekt zeigen. Die O_2 -Konzentration lag also bei diesem Versuch in einem Bereich zwischen 1 - 8 $\mu M/l$. Nicht nur die unterschiedliche Reaktion auf ionisierende Strahlen kann also ein ungefähres Maß für die Sauerstoffkonzentration im Nährmedium der Zellen sein, sondern auch die Zellverdopplungszeit.

Aus der Abb. 38 wird deutlich, daß die Zellverdopplungszeit nicht so empfindlich auf Veränderungen der O_2 -Konzentration reagiert wie die Atmungsaktivität der Zellen. Vielleicht muß man jedoch berücksichtigen, daß Froese (1962) die Messung der Atmungsaktivität an Tumorzellen durchgeführt hatte und diese einen geringeren O_2 -Verbrauch aufweisen als andere Zellarten wie z.B. die chin. Hamsterzellen von Bedford (1969), dessen Daten für die Kurve 2 der Abb. 38 verwendet wurden.

2. Koloniebildungsfähigkeit hypoxischer Zellen

2.1 Literaturübersicht

Einige der im obigen Abschnitt erwähnten Autoren berichten, daß nach der Hemmung der Zellvermehrung durch chronische Hypoxie nach einiger Zeit zunehmend Zelluntergänge auftreten. Die Überlebensfähigkeit der Zellen nach zunehmenden Zeiten chronischer Hypoxie

wurde jedoch in den wenigsten Fällen genauer getestet. Hall u.a. (1966) berichten über die Koloniebildungsfähigkeit von HeLa S3-Zellen, die im halblog. Diagramm einer Schulterkurve folgt, d.h. nach einem anfänglichen horizontalen Verlauf eine exponentielle Abnahme zeigt. So wurde innerhalb der ersten 20 h keine wesentliche Änderung der Überlebensfähigkeit gefunden. Nach 60 h überlebten jedoch nur noch 30 % der Zellen.

Bedford (1970) hat die Koloniebildungsfähigkeit tetraploider chin. Hamsterzellen nach Inkubation in O_2 -Konzentrationen von 0,8, 0,15 und 0,08 $\mu M/l$ gemessen. Er erhielt hier, wie vorher mit Hall (1966), bei HeLa-Zellen Schulterkurven, die umso steiler verliefen, je geringer die O_2 -Konzentration im Kulturmedium war. Die Dosiswirkungskurve bei nur 0,08 $\mu M/l$ zeigte eine kaum ausgeprägte Schulter.

Littbrand und Révész (1968) fanden an ELD-Ascites Tumorzellen und chin. Hamsterzellen eine im doppellog. Diagramm mehr hyperbole Abhängigkeit der Überlebensrate von der Dauer der Hypoxie, wobei sie bei chin. Hamsterzellen nach 24 h Anoxie 5,6 %, nach 48 h 1,5 % und nach 72 h 0,3 % Überlebende fanden. Die Autoren nahmen in den ersten 8 h eine unveränderte Überlebensrate an (im doppellog. System schneidet die Verlängerung der durch die Einzelwerte gehenden Geraden den 100 %-Wert bei 8 h).

Drew u.a. (1972) beobachteten bei HeLa S3-Zellen erst nach 20 h chronischer Hypoxie die Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit um etwa 1 %/h über weitere 20 h hin. Koch u.a. (1971 - 1973) fanden bei chin. Hamsterzellen nach 96 h eine fast unveränderte Überlebensfähigkeit, die PE sinkt von ca. 80 % auf nur 55 %.

Eine graduelle Abnahme koloniebildungsfähiger chin. Hamsterzellen mit der Dauer der chronisch hypoxischen Bedingungen fand auch Röttinger (pers. Mittlg.). Eine unverzügerte exponentielle Abnahme der Überlebensfähigkeit fand statt, sobald Zellen der stationären Wachstumsphase der Hypoxie ausgesetzt wurden.

Die eigenen Versuchsergebnisse zeigen eine hyperbole Dosiswirkungskurve, wobei nur in den ersten 2 h der Hypoxie eine unveränderte Überlebensrate gefunden wurde. Im Gegensatz zu der Kurve von Littbrand und Révész (1968) nehmen die Werte im späteren Kurvenverlauf immer langsamer ab. Abb. 41 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der aufgeführten Ergebnisse im linearen Diagramm.

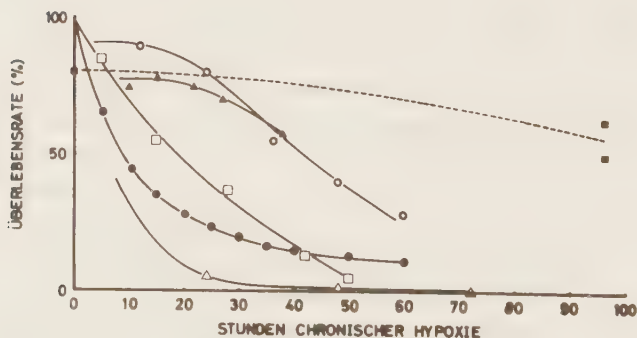


Abb. 41 Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit chin. Hamsterzellen (Δ , $\square$, $\blacksquare$, $\bullet$) und HeLa-Zellen ($\circ$, $\blacktriangle$) mit der Dauer der chronischen Hypoxie (Beispiele aus der Literatur):

- ($\circ$) Hall und Bedford (1966)
- (Δ) Littbrand und Révész (1968)
- ($\square$) Bedford (1970)
- ($\blacktriangle$) Drew u.a. (1972)
- ($\blacksquare$) Koch u.a. (1971 - 1973)
- ($\bullet$) Born (diese Arbeit)

2.2 Kritische Betrachtung der aufgeführten Arbeiten unter Einbeziehung der eigenen Ergebnisse

Wie für die Vermehrungstätigkeit der Zellen spielt auch für ihr Überleben die O_2 -Konzentration während der Kultivierung eine entscheidende Rolle. Stets wurde bei chronisch hypoxischen Zellen neben der starken Verlängerung der Zellverdopplungsrate eine mehr oder weniger starke Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit gefunden. Chronisch hypoxische Zellen überdauern also nicht nur teilungsinaktiv die O_2 -arme Periode, sondern werden zunehmend bis zum Zelluntergang geschädigt. Abb. 41 zeigt, daß die eigenen Ergebnisse eine Kurve liefern, die zwischen derjenigen von Littbrand und Révész (1968) und von Bedford (1970) liegt, wobei sich der rechte Kurvenabschnitt wie bei Littbrand und Révész asymptotisch der x-Achse nähert. Die Kurven von Hall u.a. (1966), Drew u.a. (1972) sowie diejenige aus den Angaben von Koch u.a. (1973) zeichnen sich durch sehr weite Schultern aus.

Hall u.a. (1966) verwendeten zur Kultivierung Plastikpetrischalen, die 6 h lang mit einem N_2 - CO_2 -Gasgemisch (95 % + 5 %) mit einer Durchflußrate von 6 l/h in einem Meßzylinder begast wurden, der anschließend luftdicht verschlossen wurde. Im ausströmenden Gas wurden zu diesem Zeitpunkt $0,016 \mu M/l$ O_2 gemessen. Aus den Ausführungen des letzten Kapitels folgt, daß die Zellen noch eine gewisse Zeit den aus den Plastikwänden in das Medium diffundierenden Sauerstoff veratmen. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß erst nach 20 h chronischer Hypoxie ein allmähliches Absinken der Koloniebildungsfähigkeit auftritt.

Bedford (1970) hatte seine Kulturgefäße in Reihe

geschaltet und kontinuierlich mit einem N_2 - CO_2 -Gasgemisch durchströmt. Er erwähnt nicht, welche Durchflußrate er verwendete und wie hoch sein Zellinkubulum war. Es ist daher denkbar, daß die zwar sofort einsetzende, aber nur zögernd zunehmende Schädigung der Zellen durch die Hypoxie an der langsamen Herstellung des Gleichgewichts lag. Dagegen spricht allerdings, daß die Wachstumskurve der Zellen, die mit nur $0,08 \mu M/l$ versorgt wurden, schon nach 5 h hypoxischer Bedingungen in das Plateau mündete. Nach einer pers. Mitteilung trat bei Bedford gegen Versuchsende eine zunehmende Übersäuerung der Kulturen auf, die möglicherweise zusätzlich toxisch wirkte und auch zur Verlängerung des Zellzyklus und damit der Zellverdopplungszeit beitrug (Sisken und Kinoshita 1961). Bei den eigenen Versuchen wurde der CO_2 -Gehalt des N_2 -Gases nachreguliert, um eine Übersäuerung zu vermeiden.

Littbrand und Révész (1968) begasten ihre Zellen 3 h nach der Aussaat. Sie tauschten das Medium gegen vorbegastes O_2 -armes aus, durchströmten den Tank, in dem sich die Petrischalen befanden, zunächst für 20 min mit einer sehr hohen Durchflußrate, anschließend bis Versuchsende mit 18 l/h reinem Argon, versetzt mit 5 % CO_2 . Auf diese Weise konnte in kurzer Zeit sämtliches O_2 aus dem Medium verdrängt werden. Die niedrige Überlebensrate nach 24 h - 27 h chronischer Hypoxie steht in krassem Gegensatz zu den Ergebnissen von Drew, Fairchild und Atkins (1972) sowie Koch u.a (1971 - 1973).

Wie Hall u.a. (1966) evakuierten Koch und Kruuv (1971) Zylinder mit den Petrischalen und füllten sie mehrmals

mit einem Gasgemisch aus reinem N_2 (95 %) und CO_2 (5 %) auf, worauf die Zylinder für die Dauer des Versuches verschlossen gehalten wurden. Die Herstellung des Gleichgewichts dauerte insgesamt 24 h und wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach 4 Tagen Inkubation bei $37^\circ C$ wurde das Überleben getestet. Da der minimale O_2 -Druck von nur $0,03 \mu M/l$ wohl während des gesamten Versuches gemessen wurde (es gibt jedoch keine Angaben), ist anzunehmen, daß durch die Plexiglaswand des Inkubationszylinders keine meßbaren Spuren von O_2 eindiffundieren. Wie 1971 nach 72 h, wurde auch 1973 von Koch u.a. nach 96 h chronischer Hypoxie eine fast unveränderte Überlebensrate der Zellen gefunden. Eigene, vorläufige Versuche zeigten, daß die Überlebensrate chin. Hamsterzellen unter hypoxischen Bedingungen bei Zimmertemperatur wesentlich langsamer absinkt als bei $37^\circ C$. Die Koloniebildungsfähigkeit euoxischer Zellen sinkt erst nach 30 h langsam ab. Diese Periode bei Zimmertemperatur (Koch u.a. 1971 - 1973) kurz nach der Zellaussaat mag einen positiven Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen haben, die gemessen wurde nach weiterer Inkubation bei $37^\circ C$.

Zellen mit einem langsamen Stoffumsatz, wie er z.B. bei Zellen mit sehr langsamen Generationszeiten zu beobachten ist, sind viel resistenter gegenüber O_2 -Mangel als Zellen, die vergleichsweise kurze Generationszeiten besitzen (vgl. Gifford 1963). Koch u.a. (1971 - 1973) und Littbrand und Révész (1968) verwendeten einen ähnlichen Stamm der chin. Hamsterzellen sowie ähnliche Kulturmedien (Eagle MEM + 15 % fötales Kälberserum). Koch u.a. versetzten ihre Kulturen zusätzlich mit L-Glutamin; sie begannen ihre Versuche kurz nach der Zellaussaat. Die starke Diskrepanz der Ergebnisse zeigt, wie

groß die Unterschiede auch bei gleicher Zellart sein können, wenn sie in verschiedenen Laboratorien und bei leicht modifizierten Bedingungen gezüchtet werden.

Drew, Fairchild und Atkins (1972) haben festgestellt, daß die Überlebensfähigkeit der HeLa S3-Zellen unter chronischer Hypoxie entscheidend verbessert wurde, nachdem sie bei ihren in Reihe geschalteten und kontinuierlich begasten Glaskulturflaschen alle PVC-Verbindungsschläuche durch Latex-Schläuche ersetzt hatten. Die danach erhaltene Dosiswirkungskurve ähnelt derjenigen von Hall u.a. (1966) (vgl. Abb. 41), die ebenfalls HeLa S3-Zellen verwendeten und Verbindungsschläuche aus Nylon benutzten. Drew, Fairchild und Atkins (1972) nahmen an, daß die in den PVC-Schläuchen enthaltenen toxischen Weichmacher während der Begasung in das Gas eindiffundieren und zu den Zellen gelangen. De Haan (1971) beobachtete, daß embryonale Zellen von Hühnerherzen, deren Kulturmedium mit PVC-Schläuchen in Kontakt war, ihre Spontanaktivität verlieren und nach 24 h absterben. Somit besteht bei allen Versuchen, bei denen PVC-Schläuche verwendet wurden, ohne Rücksicht auf den O_2 -Mangel die Möglichkeit der Zellvergiftung.

Bei den eigenen Versuchen wurden zum Teil PVC-Schläuche verwendet. Kontrollversuche ergaben jedoch keine merkliche Veränderung in der Überlebensrate. Falls toxische Substanzen zu den Zellen gelangen, werden sie u.U. erst in Verbindung mit dem O_2 -Mangel wirksam. Littbrand und Révész (1968) verwendeten keine PVC-Schläuche und erhielten dennoch die bisher stärkste Reduktion der Überlebensfähigkeit chin. Hamsterzellen bei chronischer Hypoxie, die sie auf ihre korrekt O_2 -freien Bedingungen zurückführen. Die Art der

Begasung ist somit von größter Bedeutung für den Inaktivierungsmodus der Zellen unter chronischer Hypoxie.

Der in dieser Arbeit gefundene Wert der Überlebensrate von ca. 15 % nach 48 h wird durch in vivo-Versuche von Suit u.a (1969) gestützt. Bei dem Versuch, ein C3H-Mammakarzinom der Maus durch kontinuierliche Gabe von IUdR (Joddesoxyuridin) zu sensibilisieren, fanden sie, daß 80 % aller hypoxischen Zellen nach 48 h sensibilisiert waren. Da nach in vivo-Untersuchungen von Tanock (1968) in einem Tumor nur euoxische Zellen DNS-Synthese betreiben, die für die Sensibilisierung durch IUdR Voraussetzung ist, muß in den 48 h ein Austausch von 80 % der hypoxischen Zellen stattgefunden haben, d.h. 80 % der hypoxischen Zellen sind abgestorben und durch Zellen aus dem vormals euoxischen Bereich ersetzt worden. Die übrigen 20 % überlebende Zellen sind vergleichbar mit den 15 % Überlebenden nach 48 stündiger Hypoxie in vitro der eigenen Versuche.

Sutherland und Durand (1973) fanden in ihrem in vitro-Tumormodell, bestehend aus im Agar-Medium schwebenden chin. Hamsterzellen, die kugelige Zellhaufen (Sphäroide) gebildet haben, eine deutliche Abhängigkeit der Nekrosebildung vom Grad der Hypoxie, wobei andere Mangelstoffe die Nekrosebildung weit weniger beeinflussen.

3. Proliferationskinetik

Es wird im folgenden eine ausführliche Übersicht über die wichtigsten Arbeiten gebracht, die sich mit der Untersuchung der Proliferationskinetik von Zellen in vitro und in vivo bei verschiedenen Bedingungen, die den Wachstumsverhältnissen im soliden Tumor nahekommen,

befassen, und insbesondere das Wachstum unter hypoxischen Bedingungen betreffen (vgl. 3.11 - 3.13). Im Anschluß daran werden die eigenen Ergebnisse im Vergleich zu den Beispielen aus der Literatur (vgl. 3.2) diskutiert.

3.1 Literaturübersicht

Mit der Proliferationskinetik hypoxischer Zellen in vitro befaßten sich bisher Bedford (1969/70) sowie Koch u.a. (1971 - 1973).

Schon früher interessierte man sich für die Proliferationskinetik von Ehrlich-Ascites Tumorzellen nach zunehmender Dauer des Wachstums in der Peritonealflüssigkeit der Maus, wo die Zellen mit steigender Anzahl auch zunehmend hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind (u.a. Lala und Patt 1966, Frindel u.a. 1967, Wiebel und Baserga 1968, Frindel u.a. 1969, Tannock 1969, Harris u.a. 1970).

Andere Autoren untersuchten die stationäre Wachstumsphase verschiedener Zellarten in Euoxie im Vergleich zu derjenigen unter hypoxischen Bedingungen (Tobey und Ley 1970, Hahn und Little 1972).

Die Frage war unter anderem, ob und welche Änderungen in den Generationszeiten und der Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen stattfinden.

3.11 Proliferationskinetik hypoxischer Zellen in vitro

Bedford (1970) untersuchte neben der Wachstumsaktivität und der Überlebensrate auch die Größe der einzelnen Zellzyklusparameter der chin. Hamsterzellen (CHL-F) bei chronischer Hypoxie. Der Vorteil seiner

Methode besteht darin, daß er Bestrahlung, Pulsmarkierung sowie Analyse der Koloniebildungsfähigkeit und der Zellzahl an Zellen aus ein und derselben Flasche vornimmt.

Der Markierungsindex der Zellkultur nimmt unter strenger Hypoxie ($0,08 \mu\text{M}/1 \text{ O}_2$) von knapp 60 % innerhalb der ersten 30 h der Dauerbegasung auf 55 % ab und erreicht nach insgesamt 50 h den 40 %-Wert. Bei der 10 fachen O_2 -Konzentration steigt der Markierungsindex zunächst auf 70 % an, fällt innerhalb von 25 h jedoch wieder auf 30 % ab (die Angaben werden Kurven entnommen, die aus nur 3 Punkten bestehen). In einem unveröffentlichten Tagungsbericht berichtete Bedford (1969) über Kurven der markierten Mitosen unter chronischer Hypoxie. Er beschickte dazu 10 in Reihe geschaltete Kulturflaschen zunächst mit $^3\text{HTdR}$, dann mit nicht markierter TdR; beide Lösungen befanden sich seit Versuchsbeginn in Seitenkammern der Flaschen. Die hohe Konzentration der unmarkierten TdR verdünnt die geringe Konzentration der ^3H -markierten TdR, so daß eine Pulsmarkierung möglich wird. Etwa 36 h nach Beginn der Begasung wurde die Pulsmarkierung mit $^3\text{HTdR}$ durchgeführt und der prozentuale Anteil der markierten Mitosen zu verschiedenen Zeiten danach bestimmt. Nach der Begasung der Kulturen mit einer O_2 -Konzentration von $0,8 \mu\text{M}/1$ erhielt Bedford eine Kurve, aus der sich eine Generationszeit von 30 h und folgende prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zyklusphasen ergibt: $(T_{G1} + T_{M/2}) : T_S : (T_{G2} + T_{M/2}) = 35 \% : 55 \% : 10 \%$. Im Gegensatz dazu beträgt die Generationszeit der Zellen unter Normalbedingungen 11,5 h und das Verhältnis der Zellen in den einzelnen Zyklusphasen $20 \% : 60 \% : 20 \%$. Die Begasung mit der O_2 -Konzentration von nur noch $0,37 \mu\text{M}/1$ ändert das Verhältnis noch weiter zugunsten der G_1 -Phasezellen:

$(T_{G1} + T_{M/2}) : T_S : (T_{G2} + T_{M/2}) = 43 \% : 47 \% : 10 \%$;
die Generationszeit beträgt 45 h. Bei der Begasung mit $0,08 \mu\text{M}/1 \text{ O}_2$ konnte keine Kurve erhalten werden. Somit wurde eine zunehmende Verlängerung aller Zyklusphasen gefunden, wobei die G_1 -Phase am stärksten und die G_2 -Phase am wenigsten betroffen ist.

Koch u.a. (1971 - 1973) verwendeten für ihre Untersuchung der Zellkinetik unter hypoxischen Bedingungen chin. Hamsterzellen vom Stamm 79-S 171.

In der Arbeit von 1971 konnten Koch und Kruuv zeigen, daß synchronisierte Zellen (abgeschüttelte Mitosen) innerhalb der ersten 8 h der Hypoxie bei einmaliger Bestrahlung Überlebensraten aufweisen, die ungefähr denjenigen genauso synchronisierter und bestrahlter euoxischer Zellen entsprechen, wenn der Sauerstoffeffekt berücksichtigt wird. Wie schon anfangs erwähnt wurde, ist die Strahlenempfindlichkeit der Zellen in den einzelnen Zyklusphasen verschieden; es handelt sich um einen dosismodifizierenden Faktor von ca. 2. Sobald Änderungen der Zellzyklusparameter auftreten, ist auch eine Veränderung der Überlebensrate zu erwarten. Nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeiten nach der Synchronisation erhielten Koch und Kruuv (1971) keine veränderte Kurve der Überlebensraten. Da die Kulturen außerdem nach verschiedenen Zeiten einen unverändert maximalen Sauerstoffeffekt zeigen, nehmen die Autoren an, daß innerhalb der ersten 8 h chronischer Hypoxie eine normale Progression im Zellzyklus stattfand.

Wie erwähnt (vgl. S.112) kann man durch Aufteilung einer Strahlendosis in kleinere Teildosen, die durch gewisse Zeitintervalle voneinander getrennt appliziert

werden, prüfen, ob die Zellen einen subletalen Strahlenschaden reparieren können. Nach Révész und Littbrand (1967) ist nur bei Anwesenheit einer minimalen O_2 -Menge und damit bei einer gewissen Atmungsaktivität (vgl. Littbrand und Révész 1969) eine Erholung vom subletalen Strahlenschaden möglich. Koch und Kruuv (1971) fanden bei ihren chronisch hypoxischen Zellen bei der Dosisfraktionierung keine Erholung und müßten demnach O_2 -Konzentrationen unter $0,26 \mu M/l$ (halbmaximale Atmungsaktivität) erreicht haben.

Howard (1968) fand eine Erniedrigung der Erholungsfähigkeit der Algenzellen bei stark reduzierter O_2 -Konzentration und Hall (1972) konnte bei chin. Hamsterzellen bei einer O_2 -Konzentration unter $0,02 \mu M/l$ keine Erholung vom subletalen Strahlenschaden nachweisen, während Elkind u.a. (1965) selbst bei O_2 -Konzentrationen von $0,001 \mu M/l$ eine Erholung beobachtet hatte. In der Mehrzahl der bisher zu diesem Thema erschienen Arbeiten konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Erholungsfähigkeit der Zellen und der den Zellen zur Verfügung stehenden O_2 -Konzentration gefunden werden. Von Bedeutung ist diese Erholungsfähigkeit hypoxischer Zellen besonders für die Strahlentherapie.

1971 konnten Koch und Kruuv keine Zyklusveränderungen an 8 h chronisch hypoxischen Zellen finden. Koch u.a. (1973a) fanden jedoch bei chin. Hamsterzellen der Plateau-Phase, die nach 4 Tagen chronischer Hypoxie erreicht wurde, bedeutende Veränderungen der Proliferationskinetik. Die Zellen wurden 2,5 h nach Aussaat für 4 Tage in den verschlossenen Zylindern bei weniger als $0,03 \mu M/l O_2$ und $37^\circ C$ inkubiert und anschließend bei Normalbedingungen neu plattiert. Wie schon erwähnt, fand dabei nur innerhalb der ersten

40 h eine Zunahme der Zellzahl um etwa das Doppelte statt; später blieb sie konstant bei kaum reduzierter Koloniebildungsfähigkeit.

Zytophotometrische Bestimmungen der DNS-Verteilung der Zellpopulation 2,5 h nach Neuaussaat der ehemals hypoxischen Zellen zeigten, daß der überwiegende Teil der Zellen einen einfachen DNS-Gehalt hat, es sich also um G_1 -Phasezellen handelt, wie Kontrollen an synchronisierten euoxischen Zellen bestätigten. Dosiseffektkurven der hypoxischen Zellen 2,5 h nach Neuaussaat verliefen jedoch wie diejenigen asynchroner Kontrollpopulationen und nicht wie diejenigen gleich behandelte synchroner G_1 -Phasezellen. So wie die Überlebensrate der Zellen nach einer einmaligen Bestrahlung, ist auch der Verlauf der Dosis-effektkurve abhängig von dem Alter der Zellen im Zyklus.

Wachstumskurven nach Beendigung der 4 Tage dauernden chronischen Hypoxie zeigten, daß nach Neuaussaat der Zellen eine fast normale exponentielle Zellvermehrung stattfindet, abzüglich einer Verzögerung, die dadurch entsteht, daß 45 % der Zellen nicht überlebensfähig sind und langsam eliminiert werden. Eine synchronisierte Zellpopulation zeigte dagegen deutliche Stufen in der Wachstumskurve.

Die Messung der $^3\text{HTdR}$ -Aufnahme der Zellen nach Puls-markierung zu verschiedenen Zeiten nach der Neuaussaat ergab einen langsamen Anstieg der $^3\text{HTdR}$ -Inkorporation, gemessen an der Zunahme der Impulse pro Minute und Zelle im Szintillationszähler. Eine synchrone Population ergab dagegen den typischen sinusförmigen Verlauf der $^3\text{HTdR}$ -Inkorporation. Die Autoren erklären diese Diskrepanz zwischen den zytophotometrisch

gewonnenen Daten und den übrigen Ergebnissen dadurch, daß die hypoxischen Zellen der stationären Wachstumsphase zwar den DNS-Gehalt "vor-DNS-synthetisierender" Zellen besitzen, sich jedoch nicht wie G_1 -Phasezellen verhalten. Kritisch wäre dazu anzumerken, daß die zytophotometrische Untersuchung von 25 Einzelzellen noch keinen repräsentativen Querschnitt einer Zellpopulation darstellt.

Die Beobachtung einiger Einzelzellen nach Neuplattierung zeigte, daß koloniebildungsfähige Zellen die erste Teilung erst nach 9,3 h durchmachen, wobei die Generationszeit unter Normalbedingungen 10,9 h beträgt. Diese lange Verzögerung der ersten Teilung könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich ein Großteil der Zellen in der G_1 -Phase befunden hat.

3.12 Proliferationskinetik von Ascites Tumorzellen bei zunehmend hypoxischen Bedingungen

Strahlenbiologische Untersuchungen am Ehrlich Ascites-Tumor der Maus zeigten, daß mit zunehmender Wachstumsdauer und Zellzahl die O_2 -Konzentration in der Peritonealflüssigkeit abnimmt, so daß die Tumorzellen, die sich nicht in direkter Nähe des durchbluteten Peritoneums befinden, hypoxisch werden. Am 7. Tag der Transplantation der Zellsuspension sind ca. 80 % der Zellen hypoxisch (Deschner und Gray 1959), wie auch O_2 -Messungen von Del Monte (1967) bestätigten.

Im Unterschied zu den oben besprochenen Verhältnissen in vitro handelt es sich in vivo bezüglich des Grades der Hypoxie um fluktuierende Mischpopulationen. Im soliden Tumor reicht die örtliche O_2 -Versorgung der Zellen von Euoxie bis zur Anoxie.

Lala und Patt (1966) untersuchten die Zellkinetik des Ehrlich Ascites-Tumors. Die hyperdiploiden Zellen wurden

durch wöchentliche Passagen in Schweizer Webster-Mäusen gezüchtet. Die Zellen vermehren sich in den ersten 3 Tagen exponentiell, machen dann eine Phase des verlangsamten Wachstums durch und gelangen schließlich in die Plateau-Phase.

Intraperitoneale Injektion von $^3\text{HTdR}$ in einer Anzahl von Tieren ermöglichte die Bestimmung der Kurve der markierten Mitosen zu verschiedenen Zeiten nach der Pulsmarkierung. Die Dauer der Zellzyklusparameter am 1. Tag nach der Transplantation betrug: $T_C = 8 \text{ h}$, $T_S = 6 \text{ h}$, $T_{G2+M} = 2 \text{ h}$ und $T_{G1} = \text{ca. } 0 \text{ h}$. Am 4. Tag betrug sie: $T_C = 17 \text{ h}$, $T_S = 13 \text{ h}$, $T_{G2+M} = 4 \text{ h}$ und $T_{G1} = \text{ca. } 0 \text{ h}$. Am 7. Tag wurde eine T_C von 22 h, eine T_S von 18 h, eine T_{G2+M} von 4 h gefunden. Die T_{G1} zeigte keine wesentliche Verlängerung im Gegensatz zu den übrigen Zyklusphasen. Die Berechnung der growth-fraction zeigte, daß ein steigender Anteil der Population sich der Proliferation entzieht. Der Zellverlust hingegen blieb konstant.

Wiebel und Baserga (1968) verwendeten einen hypotetraploiden Stamm von Ehrlich Ascites-Tumorzellen, der in Fels A Mäusen gezüchtet wurde. Die Autoren untersuchten die Zyklusparameter der Zellen nach 5 Tagen Wachstum, wenn der Tumor hypoxisch ist und sofort nach Transplantation auf neue Mäuse. Autoradiographische Messungen zeigten, daß sich die Generationszeit nach Transplantation von 47 auf 21,5 h verkürzte, wobei sich T_S von 26,5 h auf 16 h, T_{G2} von 5,5 h auf 4 h und T_{G1} von 14 h auf 0,5 h verkürzten. Hier hat also eine bedeutende Veränderung insbesondere der G_1 -Phasendauer stattgefunden.

Frindel u.a. (1969) untersuchten einen Ascites Tumor (NCTC 2472) der C3H Maus zu verschiedenen Zeiten nach der intraperitonealen Injektion von 10^6 Zellen. Die

Kurven der pulsmarkierten Mitosen zeigten, daß sich die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen mit dem Tumoralter verlängert. Die Generationszeit betrug am 2. Tag 13 h, am 4. Tag 17 h und am 12. Tag 40 h. Die S-Phasendauer nahm von 9 h auf 21 h am 12. Tag zu, während sich die G_1 -Phase von 2,5 h über 6 h auf 15 h verlängerte. Die G_2 - und M-Phasen verlängerten sich im gleichen Zeitraum von 1,6 h auf 4,5 h. Der Mitoseindex blieb etwa konstant, der Markierungsindex hingegen nahm leicht ab (von 51,6 % über 45,5 % auf 39 %). Zytophotometrische Untersuchungen eines 18 Tage alten Tumors ergaben, daß 67 % der Zellen sich in der G_1 -Phase, 13 % in der S-Phase und 20 % in der G_2 - und M-Phase befanden. Die growth-fraction blieb unverändert. Die Verdopplungszeit stieg jedoch wesentlich schneller an als die Generationszeit; es wurde daher ein starker Anstieg der Zellverlustrate angenommen.

Harris u.a. (1970) untersuchten am hyperdiploiden Ehrlich-Ascites Tumor der Schweizer Webster-Maus die zytokinetischen Änderungen während des Tumorstwachstums sowie mögliche biochemische Mechanismen.

Die Generationszeit dieser Zellen nahm von 9,5 h (am 2. Tag nach Transplantation von 10^7 Zellen) auf 39 h (am 14. Tag) zu, während der Markierungsindex von 80 % auf 40 % sank. Bei Dauermarkierung stieg der Markierungsindex langsamer an, als es aufgrund der mit der Kurve der markierten Mitosen bestimmten $G_1 + G_2 + M$ -Phasenlängen zu erwarten wäre. Dies Ergebnis deutet auf eine Population von extrem langsamen Zellen besonders der G_1 -Phase hin. Da die DNS-Synthese der transplantierten Zellen, gemessen am Anstieg des Markierungsindex nach Dauermarkierung, durch Actinomycin nicht gehemmt wurde, wie es bei Anwesenheit eines großen Anteiles von G_0 -Zellen

an der Population erwartet werden kann (Baserga 1968), schlossen die Autoren, daß es sich nicht um G_0 -Zellen handeln kann. G_0 -Zellen besitzen den DNS-Gehalt von G_1 -Phasezellen, sind jedoch nicht-zyklierende Zellen. Nach Überimpfung von 14 - 16 Tage alten Tumorzellen auf neue Mäuse nimmt der Markierungsindex erst nach einer Verzögerung von 5 - 6 h zu und erreicht 4 h später den 80 %-Wert. Dieser Anstieg des Markierungsindex war gehemmt, wenn den Tieren nur noch 6 % O_2 in der Atemluft angeboten wurde.

Die enge Beziehung zwischen der Größe des Markierungsindex und dem Grad der Hypoxie weist darauf hin, daß in einem Ascites-Tumor Zellen nur dann aus der G_1 in die S-Phase wandern, wenn sie von Zeit zu Zeit durch die größere Nähe zur Peritonealwand mit O_2 versorgt werden.

3.13 Vergleich der Proliferationskinetik von Tumorzellen in vitro und in der soliden Tumorform in vivo

Frindel u.a. (1967) untersuchten einen Ascites Tumor (NCTC 2472) in vitro und subkutan bei C3H Mäusen als soliden Tumor.

Es konnten nach Erreichen der Plateau-Phase in vitro oder bei wachsender Größe des soliden Tumors keine Zyklusveränderungen wie bei der Ascitesform des Tumors festgestellt werden. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten der gleichen Zellart bei verschiedenen Zuchtbedingungen können bei den in vivo-Versuchen immunologische Faktoren oder bei alternden Ascites-Tumoren Änderungen des pH-Wertes und des Glukose- und Milchsäuregehaltes sein. Man sollte vor allem beachten, daß solide Tumoren im Gegensatz zu der Ascitesform und besonders bei Versuchen in vitro eine heterogene Population darstellen, bei der hauptsächlich die Zellen

mit der kürzesten Generationszeit zur Beobachtung gelangen.

Tannock untersuchte die Zellkinetik eines hyperdiploiden Ehrlich-Ascites Tumors in solider (subkutan) und Ascitesform bei weiblichen C 57 Mäusen. Es wurden die Kurven der markierten Mitosen und der Anstieg des Markierungsindex nach Mehrfachmarkierung bei 2,6 und 10 Tage alten Tumoren nach Implantation von $1,7 \times 10^6$ Zellen für die Ascitesform und bei Gewichten des soliden Tumors zwischen 0,5 bis 1,8 g bestimmt.

Mit dem Computer-System nach Barrett (1966) wurden Kurven berechnet, die den experimentellen Werten der puls-markierten Mitosen angepaßt sind. Dabei wurde die Normalverteilung der einzelnen Zyklusphasen angenommen (vgl. Abb. 42)

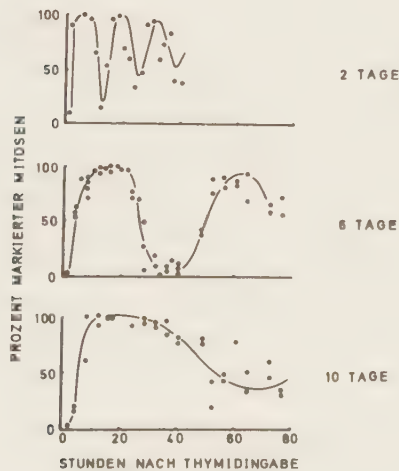


Abb. 42 Berechnete Kurven der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung des Ehrlich Ascites-Tumors 2,6 und 10 Tage nach Neutransplantation (Tannock 1969).

Der 6 Tage alte Ascites-Tumor hatte eine Zellverdopplungszeit von 2,5 Tagen, die sich am 10. Tag auf 6 Tage erhöhte. Die mittlere Generationszeit stieg von 12 h auf 44 h (6. Tag) und 83 h (10. Tag). Die S-Phasenlänge erhöhte sich dabei von 9,2 h am 1. Tag über 22 h am 6. Tag auf 48 h am 10. Tag des Tumorwachstums. Die G_2 -Phase verlängerte sich von 1,5 h über 5 h auf 6 h am 10. Tag. Die stärkste Verlängerung erfuhr die G_1 -Phase mit 1,7 h am 2. Tag über 18 h auf 40 h am 10. Tag des Tumorwachstums. Der Markierungsindex der Zellpopulation nach Pulsmarkierung nahm stärker ab als der prozentuale Anteil der S-Phasezellen an der Generationszeit. Der Markierungsindex betrug nach 2 Tagen 69 %, nach 6 Tagen 42 % und nach 10 Tagen 25 %. Es wurde ein zunehmender Zellverlust, jedoch eine kaum sinkende growth-fraction berechnet. Der solide Tumor besaß dagegen noch nach 10 Tagen Wachstum eine Verdopplungszeit von 17 h; T_S betrug 10,5 h, T_{G2} 3,0 h und T_{G1} 4,0 h. Die Zellverlustrate betrug 90 %. Auch hier gilt, wie von Frindel u.a. (1969) erwähnt, daß die pulsmarkierte Mitosenkurve unempfindlich ist gegenüber Zellzykluszeiten, die wesentlich länger sind als der Mittelwert der Generationszeiten der meisten Zellen. Falls daher im soliden Tumor Zellzyklusverlängerungen in den hypoxischen Regionen auftreten, könnten sie durchaus von der größeren Masse der euoxischen Zellen überlagert werden (Tannock 1972). Hypoxische Zellen mit langen Zellzykluszeiten haben nur eine geringe Chance, sich zu teilen, da ihre Lebensdauer in soliden Tumoren beschränkt ist.

3.14 Proliferationskinetik von Zellen in der stationären Wachstumsphase

Tobey und Ley (1970) untersuchten an chin. Hamsterzellen (CHO) in Zellsuspension das Proliferationsverhalten der

Zellen in der stationären Wachstumsphase unter euoxischen Bedingungen.

Ab einer Zellkonzentration von $6,5 \times 10^5$ Zellen/ml erhöht sich die Verdopplungszeit, die bei exponentieller Vermehrung 16 h beträgt. In einem folgenden Zeitraum von 30 h erhöht sich die Zellzahl nur noch um 30 - 40 % und bleibt anschließend bei einer Zellkonzentration von $8 - 9 \times 10^5$ Zellen/ml konstant. Über 95 % der Zellen bewahren bis zu 80 h lang eine unverminderte Koloniebildungsfähigkeit.

Pulsmarkierung nach verschiedenen Zeiten der Zellvermehrung zeigte, daß sich gleichzeitig mit der Reduktion der Zellvermehrung auch der Markierungsindex bis gegen 0 % verringert. Zellen, die sich 50 - 80 h in der stationären Wachstumsphase befunden hatten und mit frischem Medium verdünnt wurden, zeigten 4 h später einen raschen Anstieg des Markierungsindex. Das weist darauf hin, daß die Zellen etwa in der Mitte der G_1 -Phase aufgestaut waren. Die erst nach 12 h einsetzende Zellvermehrung bestätigt die Deutung.

Hahn und Little (1972) untersuchten die Proliferationskinetik u.a. von chin. Hamsterfibroblasten (HA) in der stationären Wachstumsphase in Monolayerkulturen. Je nach der Versorgung der Zellen mit Nährstoffen hört die Zellvermehrung früher oder später auf. Zellen der logarithmischen Wachstumsphase besitzen eine T_C von 16 h, eine T_S von 6 h, eine T_{G2} von 2 h und eine T_{G1} von 8 h.

Der Markierungsindex nach Pulsmarkierung sinkt von ca. 55 % auf 10 % und der Mitoseindex von 3,5 % auf < 1 %. Die Überlebensrate der Zellen ist ebenfalls vermindert. Die Zahl der im Zyklus befindlichen Zellen wurde bestimmt durch Dauermarkierung für eine Zeit,

die doppelt so lang ist wie die Dauer der S-Phase. Bei den gut ernährten Zellen der Plateau-Phase betrug die Zahl ca. 15 %, während sie bei den hungernden Zellen der Plateau-Phase nur 1 % betrug. Auch der Markierungsindex sank auf 1 %. Die Koloniebildungsfähigkeit dieser Zellen blieb jedoch hoch.

Die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zyklusphase gibt die Tabelle von Hahn und Yang (1970) wieder (zitiert nach Hahn und Little 1972).

Phase	G ₁	S	G ₂	M	zykl. Zelle
Expon. Wachstum	40-50	35-40	10-15	4	
Gefütterte Plateau-Ph.	80-85	10-15	3-5	~1	15
Ungef. " (früh)	50-70	5-20	20-30	<1	
" " (spät)	80-90	5-10	0-5	«1	1

Subkultivierung in frischem Medium zeigte, daß die Zellen der G₁-Phase nicht synchronisiert in der ungefütterten Plateau-Phase vorliegen. Chapman u.a. (1970) fanden dagegen bei chin. Hamsterzellen unter gleichen Bedingungen eine Teilsynchronisation, während Tobey und Ley (1970) von einem synchronen Verhalten der Zellen berichten.

3.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu den Beispielen aus der Literatur

Die ausgewählten Beispiele aus der Literatur machen deutlich, daß Zellen, die verlängerte Verdopplungszeiten aufweisen oder sich in der Plateau-Phase des Wachstums befinden, ähnliche Änderungen ihrer Zellparameter aufweisen. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Verlängerung insbesondere der G₁-Phase der Zellen, wobei die Ursache Verringerung des O₂-Partialdruckes, pH-Wert-Änderungen, Temperaturschwankungen, Hunger oder Übervölkerung sein können. Manche dieser Veränderungen

im Zellmilieu treten gleichzeitig auf und sind schwer voneinander zu trennen.

Die Kurve der markierten Mitosen wurde von der Überwiegenden Zahl der Autoren verwendet, um die Länge der einzelnen Zyklusphasen zu bestimmen. Sie ist einfach zu erhalten und ermöglicht Aussagen über die mittlere Länge und Variationsbreite aller Zyklusphasen. In vitro unter O_2 -armen Bedingungen bereitet eine Pulsmarkierung gewisse Schwierigkeiten. Bedford (1969) umging sie dadurch, daß er nach der Zugabe des markierten Thymidins eine weit höhere Menge unmarkierten Thymidins zu den Zellen gab, die den intrazellulären Pool der Nukleinsäurevorstufen überschwemmte und so die markierten Vorstufen herausverdünnte. Es ist jedoch bekannt (Xeros 1962), daß hohe Konzentrationen von Thymidin die Zellen an dem Übergang von der G_1 - in die S-Phase auflaufen lassen. Niedrige Konzentrationen mögen zwar keine Synchronisation, aber u.U. eine Verlangsamung des Zellzyklus an der betreffenden Stelle hervorrufen. In den eigenen Versuchen wurde daher ein Mediumwechsel vorgezogen. Obwohl während des Mediumwechsels Spuren von O_2 eingedrungen sind (durch die Verwendung von Silikonschläuchen und einer nicht vorbegasteten Spritze), konnte keine verwertbare Kurve erhalten werden, da kein deutlicher Abfall des Index der markierten Mitosen auftrat. Wie bei der Kurve von Frindel u.a. (1969) bei den 18 Tage alten Ascites-Tumorzellen, können nur Angaben über die Dauer der G_2 - und ganz begrenzt der S-Phase gemacht werden.

Die G_2 -Phase hat sich mit einer mittleren Dauer von 2 h nur unwesentlich verlängert im Vergleich zu dem Kontrollwert von ca. 1,5 h; ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellpopulation hat daher stark abgenommen. Dagegen war

bei Bedford (1969) die G_2 -Phase unter $0,43 \mu\text{M/l O}_2$ proportional zur Generationszeit verlängert.

Um den Zellfluß aus der G_2 -Phase in die Mitose zu ermöglichen, scheint ein gewisses Maß an Proteinsynthese notwendig zu sein (Kishimoto und Liebermann 1964, Petersen und Andersen 1965, Tobey u.a. 1966 und Siken und Wilkes 1967), die bei Ehrlich Ascites-Zellen unter Hypoxie abnimmt (Harris u.a. 1970) und die Ursache für die Verlängerung der G_2 -Phase bei einigen Zellarten sein kann.

Der Mitoseindex erfuhr eine der zunächst auffallendsten Veränderungen unter hypoxischen Bedingungen.

Eine Veränderung des Mitoseindex bedeutet bei gleichbleibender Mitosedauer die Änderung der Wachstumsrate (Geburtsrate) der Population. Die rasche Abnahme des Mitoseindex wurde in allen Fällen einer verlangsamten Zellvermehrung gefunden, in vivo und in vitro. Ausnahme: Baserga und Gold (1963) fanden bei hypoxischen Ehrlich Ascites-Tumorzellen einen erhöhten Mitoseindex, wobei hier methodische Fehler eine Rolle spielen dürften.

Die Mitosedauer, die nach eigenen Versuchen unter chronischer Hypoxie kaum verlängert ist, hat offenbar einen recht konstanten Wert, der zwischen 0,4 bis 1,0 h bei den verschiedenen Zellarten schwanken kann.

Auch der Markierungsindex nach Pulsmarkierung macht nach zunehmenden Zeiten der chronischen Hypoxie bei Zellen in vitro und in vivo charakteristische Veränderungen durch, die eine Umverteilung der Zellen auf die Zyklusphasen anzeigen. Nach 14 h chronischer Hypoxie wurde bei den eigenen Versuchen über einen Zeitraum von 24 h ein gleichbleibender Markierungsindex

von 60 % gefunden. Erst später fand eine zunehmende Verringerung innerhalb von weiteren 14 h auf wenige Prozent statt.

Bedford fand bei chronisch hypoxischen Zellen ($0,08 \mu\text{M}/1 \text{ O}_2$) über 30 h lang einen relativ konstanten Markierungsindex, der im weiteren Verlauf des Versuches abnahm. Bei den Zellkulturen, die mit $0,8 \mu\text{M}/1 \text{ O}_2$ begast wurden, fand er dagegen zunächst eine Erhöhung des Markierungsindex, der jedoch eine Abnahme folgte. Koch u.a. (1973a) fanden nach 96 h chronischer Hypoxie nur eine stark verringerte $^3\text{HTdR}$ -Einbaurrate.

Eine kontinuierliche Abnahme wurde bei hypoxischen Tumorzellen und Zellen der stationären Wachstumsphase *in vitro* beobachtet (u.a. Lala und Patt 1966, Tannock 1968, 1969, 1970, Frindel u.a. 1967, 1969, Wiebel und Baserga 1968, Hahn und Little 1972). Es findet also unter den genannten Bedingungen stets eine Änderung in der prozentualen Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen statt, wobei die G_1 -Phase als die "potentielle Ruhephase" (Epifanova und Terskikh 1969), bevorzugt wird. Meist findet gleichzeitig eine Verlangsamung der Flußraten innerhalb der S-Phase statt, die - wie die Kurven der markierten Mitosen bei Zellen *in vitro* und bei Ascites-Tumorzellen zeigen - sich durch eine verlängerte S-Phasendauer ausdrückt.

Bei Dauermarkierung wird die Flußrate der Zellen aus der G_1 -Phase in die S-Phase beobachtet. Die eigenen Versuche zeigten, daß sie nach 14 h chronischer Hypoxie von 7,16 %/h auf 1-2 %/h gesunken ist. Da der Markierungsindex in dieser Zeit etwa konstant bleibt, bedeutet das, daß die S-Phasendauer um ca. das 3 - 7fache des normalen Wertes erhöht ist. Bei normal verteilten S-Phaselängen kann man außerdem aus dem Anstieg des Markierungsindex

bei Dauermarkierung die maximale Länge der $G_1 + G_2 + M$ -Phasen bestimmen (Wimber 1963, Defendi und Manson 1963, Baserga und Wiebel 1968), wobei G_1 -Phasenlängen zwischen 20 - 40 h gefunden wurden (T_{G_1} der Kontrollkultur beträgt 2 - 4 h, im Mittel 2,7 h).

In einem Fall wurde der Anstieg des Markierungsindex bei Dauermarkierung hypoxischer Zellen bis zum 100 %-Wert verfolgt. Es wurde keine deutliche Änderung in der Steigung bis 90 % gefunden, dann erst erfolgte eine Abflachung und asymptotische Annäherung an den 100 %-Wert des Markierungsindex. Daraus ist zu entnehmen, daß alle Zellen an der Zellproliferation trotz hypoxischer Bedingungen teilnahmen, daß also die Wachstumsfraktion (growth-fraction) 1 war. Dieses Ergebnis mag nicht repräsentativ sein, denn alle Versuche wurden über möglichst kurze Zeiträume durchgeführt, da zu erwarten ist, daß laufend Veränderungen der Zellflußraten stattfinden, die es schwierig machen, die Werte am Ende eines Versuches mit denen zu Beginn in Verbindung zu bringen. Hahn und Little (1972) fanden bei Dauermarkierung von gefütterten Plateau-Phasezellen nach etwa 10 h eine graduelle Verlangsamung des sonst linear ansteigenden Markierungsindex. Sie postulieren daher das Vorkommen nicht-zyklischer Zellen, sog. G_0 -Zellen oder sehr langsam proliferierender Zellen in ihrer Kultur. Ungefütterte Zellen der Plateau-Phase befinden sich dagegen zum größten Teil in einer Art Ruhepause. In den Sphäroiden von Sutherland und Durand (1973) findet in der Hungerperiode ebenfalls keine Zellvermehrung statt.

Die growth-fraction ist besonders bei soliden Tumoren von Interesse. Tannock (1969) verwendete die berechnete S-Phasenverteilung, die er aus der Kurve der markierten Mitosen erhielt und die Kurve des Anstieges des Markierungsindex nach Dauermarkierung, um den Anteil der

sich an der Proliferation beteiligenden Zellen zu erfassen. Im chronisch hypoxischen Ascites-Tumor und in den hypoxischen Regionen des soliden Tumors fand Tannock (1968) einen verlangsamten Anstieg des Markierungsindex nach Dauermarkierung im Vergleich zu den Ergebnissen bei euoxischen Zellen. Wie bei Hahn und Little (1972) könnte man dabei einen steilen Anfangsanstieg von einem nach 12 h abflachenden Kurventeil trennen und so die Population in schnell und langsam zyklierende Zellen aufteilen. Wenn man annimmt, daß der Zellverlust nicht nur in der G_1 - oder G_2 -Phase stattfindet, kann es sich aber auch um eine Zellpopulation mit einem breiten Spektrum der G_1 -Phasenlängen handeln.

Bei den eigenen Versuchen ist der Zellverlust in den ersten 24 h der chronischen Hypoxie noch gering, später steigt er zunehmend an. Da die Versuche der Dauermarkierung nicht über einen längeren Zeitraum als 24 h durchgeführt wurden, ist der gemessene Anstieg des Markierungsindex noch nicht beeinflußt durch den Zellverlust. Die Beobachtung, daß nur 25 % der Zellen nach 24 h chronischer Hypoxie noch Kolonien bilden können, ist ein Hinweis darauf, daß schon 3/4 aller Zellen letal geschädigt sind, obwohl kein Zellverlust stattfindet.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei soliden Tumoren kann man bei den 14 - 24 h chronisch hypoxischen Zellen keine Reduktion der growth-fraction feststellen. Die stark verlängerten Verdopplungszeiten weisen vielmehr auf eine Zellpopulation mit durchweg verlängerten Generationszeiten hin. Die Zellpopulation enthält eine Zellfraktion von höchstens 1 % normal oder vergleichsweise schnell zyklierenden Zellen.

Die verstärkt einsetzenden Zelluntergänge werden durch die abnehmende Zahl der im Kulturgefäß festsitzenden

Zellen angezeigt (vgl. Abb. 13). Etwa 5 % der noch fest-sitzenden Zellen sind schon tot, sie nehmen den Farbstoff Eosin auf. Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nimmt nur in den ersten 24 h rasch ab, dann sinkt sie nur noch unwesentlich. Es hat den Anschein, daß die Zellen am ersten Tag nach Beginn der hypoxischen Bedingungen ungeachtet ihrer Koloniebildungsfähigkeit noch aktiv am Zellzyklus teilnehmen, sich ihm später zunehmend entziehen und absterben, so daß nach 48 h nur noch die Zellen mit der noch unbegrenzten Teilungsfähigkeit markiert werden, d.h. sich am Zellzyklus beteiligen.

Der Zellverlust ist nach Röttinger (pers. Mittlg.) umso höher, je dichter die Zellkultur gewachsen ist und je größer der Nährstoffmangel ist.

Neben der charakteristischen Verringerung des Anstieges des Markierungsindex bei chronisch hypoxischen Zellen wurde bei den eigenen Versuchen auch eine vergleichbare Verringerung des Anstieges der mittleren Silberkornzahl über den markierten Kernen gefunden. Während der Anstieg des Markierungsindex um den Faktor 4,7 verlangsamt ist, beträgt hier der Faktor ~ 4 im Vergleich zu den Kontrollwerten. Dieser Unterschied mag zufällig sein, könnte aber auch dahingehend gedeutet werden, daß der Markierungsindex nach Dauermarkierung durch die breitere Streuung der G_1 -Phasenlängen im Vergleich zu den S-Phasenlängen langsamer ansteigt als die mittlere Silberkornzahl pro Kern. Während es sich im ersten Fall um den Zellfluß von einem Zellkompartiment in das nächste handelt, findet im zweiten Fall eine direkte Messung der relativen S-Phasenlänge durch die $^3\text{HTdR}$ -Einbaugeschwindigkeit statt.

Die geringe Silberkornzahl über den Kernen hypoxischer Zellen kann man daher auf eine verlangsamte Einbaurate

des $^3\text{HTdR}$ infolge einer Verlängerung der S-Phasendauer zurückführen. Tannock (1970) vermutet allerdings, daß die niedrige Silberkornzahl in den der Nekrose nahen Tumorregionen bei seinen Untersuchungen der Tumorzellkinetik durch den großen endogenen Pool der unmarkierten DNS-Vorstufen, die aus dem nekrotischen Bereich ausdiffundieren, verursacht wird. Da in vitro die niedrige Silberkornzahl über den Kernen vor dem Beginn des Zellverlustes zu finden ist, kann man annehmen, daß die Bestimmung der S-Phasendauer mit Hilfe der Messung der $^3\text{HTdR}$ -Einbaurrate auch unter hypoxischen Bedingungen in den ersten 24 h nicht durch Störungen des Thymidin-Pools der Zellen verfälscht wird. Vielmehr stimmen die von Frindel u.a. (1967) und Tannock (1970) in den hypoxischen Tumorregionen gefundenen niedrigen Werte der Silberkornzahlen im Vergleich zu den höheren Werten an der euoxischen Tumorrandzone gut mit den eigenen Ergebnissen überein: Es wurde eine Verringerung der mittleren Silberkornzahl etwa um den Faktor 4 gefunden. Dieses Resultat mag ein Hinweis darauf sein, daß Zellen in vivo und in vitro in mancher Hinsicht gleichartig auf O_2 -arme Bedingungen - u.a. mit einer Verlängerung der S-Phasendauer - reagieren, obwohl die von Tannock (1968) sowie Frindel u.a. (1967) veröffentlichten und oben kritisch betrachteten Kurven der markierten Mitosen dagegen sprechen.

Zur Bestimmung der S-Phasendauer mit Hilfe der $^3\text{HTdR}$ -Einbaurrate konnte unter hypoxischen Bedingungen die einfachere Methode von Stanners und Till (1960) - Auszählung der Silberkörner über den Metaphasefiguren der Mitose nach zunehmenden Zeiten der Dauermarkierung bis zur Sättigungsphase - wegen des niedrigen Mitoseindex nicht verwendet werden.

Bei der Auszählung der markierten Interphasenkerne hingegen konnte diese Sättigung der Silberkorndichte nach Beendigung der S-Phase nicht festgestellt werden, da

der Zellfluß in die und aus der S-Phase sowie durch die Mitose die mittlere Silberkornzahl verdünnten. Die Verteilung der Silberkornzahlen pro Kern nach Größenordnungen wurde von Maloney u.a. (1962) verwendet, um den wahren Anstieg der mittleren Silberkornzahl pro Kern und Zeit nach Dauermarkierung zu erhalten. Dazu wurde von der Seite der höheren Silberkornzahl ein konstanter Abschnitt der Verteilung abgemessen und an dem Schnittpunkt die Größenordnung der Silberkornzahl abgelesen. Bei den eigenen Verteilungen konnte diese Methode nicht verwendet werden, da das unregelmäßige Vorkommen von Zellen mit sehr hohen Silberkornzahlen die genauen Abstandsmessungen unmöglich machten.

Wie schon bei den Ergebnissen erwähnt wurde, nimmt die mittlere Silberkornzahl nach ca. 4 Tagen Expositionszeit wegen des beginnenden image fading nur noch langsam zu. Koburg (1963) hat beobachtet, daß das Spektrum der Silberkorngrößenklassen bei hoher Expositionszeit breiter wird. Offensichtlich fällt der Wettlauf zwischen Silberkornverblassen und Neuentstehung durch die ^3H -Zerfälle im Laufe der Expositionszeit zugunsten der stärker markierten Kerne aus, obwohl eine Zunahme der Silberkörner bei allen Kernen stattfindet. Auf diese Weise können bei den lang exponierten Präparaten der chronisch hypoxischen Kulturen die Silberkornverteilungen beeinflußt werden, so daß die gemessene mittlere Silberkornzahl und in der Folge auch der Anstieg pro Zeiteinheit zu hoch ist. Die S-Phasendauer der chronisch hypoxischen Zellen vermindert sich dagegen. Gleiches gilt für hoch exponierte euoxische Zellen (vgl. Tabelle 6, Seite 58).

Die Silberkornverteilungen (Abb. 28-30) zeigten, daß es sich um Normalverteilungen handelt, die jedoch erhebliche Abweichungen aufweisen, da sich die Kurven aus nur 100 Einzelmessungen zusammensetzen.

In der Literatur werden für verschiedene, aber auch

für gleiche Zellarten konstante oder ungleiche über die S-Phase verteilte Syntheseraten angegeben (konstant: z.B. Edwards u.a. 1960, Dendy und Cleaver 1964, Kozuka und Moore 1966, Lang und Müller und Maurer 1968; ungleich: Terasima und Tolmach 1963, Lederer und Kiefer 1968).

Die eigenen Ergebnisse sprechen für eine eher konstante DNS-Syntheserate der chin. Hamsterzellen bei Normalbedingungen und wohl auch bei chronisch hypoxischen Bedingungen, zumindest 14 - 24 h nach Beginn der Hypoxie, obwohl die impulszytophotometrischen Daten darauf hindeuten, daß die Verlängerung nicht für alle S-Phasezellen gleichzeitig beginnt.

Neben einer Verminderung der Mitosen sowie der G_2 -Phasezellen vermindern sich in den ersten 6 - 12 h der Hypoxie zunächst auch die späten S-Phasezellen im Gegensatz zu den Zellen der mittleren und frühen S-Phase (vgl. Abb. 36,37). Die zellkinetischen Untersuchungen wurden jedoch erst nach 14 stündiger Hypoxie durchgeführt, also zu einem Zeitpunkt, in dem keine Schwankungen oder Anteile der S-Phasezellen an der Zellpopulation mehr auftreten.

3.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Strahlentherapie

Unter hypoxischen Bedingungen in vitro wie auch in vivo bei Ascites-Tumorzellen findet eine zunehmende Veränderung der Zellzyklusparameter statt. Neben einer Erhöhung der Zellverdopplungszeit tritt meist auch eine Verlängerung der Generationszeit auf, die sich hauptsächlich aus längeren G_1 - und S-Phasezeiten ableiten läßt. Gleichzeitig können Teilsynchronisationen nach längerer Dauer der Hypoxie auftreten. Ein Ausscheren aus dem Zyklus in eine G_0 -ähnliche Phase konnte bei in vitro-Experimenten und den Ascites-Tumorzellen nicht nachgewiesen werden. Die zellkinetischen Ergebnisse an soliden experimentellen Tiertumoren (Frindel u.a. 1967,

Tannock 1968) wiesen auf eine relativ ungestörte Proliferationsaktivität eines Teiles der Gesamtzellpopulation hin. Die bei den soliden Tumoren mit der Zeit abnehmende growth-fraction zeigt, daß ein wachsender Anteil der Zellpopulation und zwar des hypoxischen und anoxischen Tumorbereiches, sich dem normalen Zellzyklus entzieht. Die Verminderung der growth-fraction kann allerdings durch stark verlängerte Zyklusphasen vorge-täuscht werden. Schließt man von den Ergebnissen in vitro auf die Verhältnisse in vivo, könnte man eine Teilsynchronisation oder das Liegenbleiben der Zellen in der G_1 -Phase annehmen, wodurch eine Reduktion der growth-fraction erreicht würde.

Die Untersuchungen der verschiedenen Autoren an Zellen in vitro und Ascites-Tumorzellen zeigten, daß der Grad und die Dauer der Hypoxie ausschlaggebend ist für das Ausmaß der Veränderungen der Flußraten der Zellen im Zyklus.

Nach Sinclair (1968) zeigen euoxische und hypoxische Zellen in vitro, die eine große G_1 -Phasenlänge besitzen, eine erhöhte Strahlenresistenz in der G_1 - und Mitte bis Ende der S-Phase sowie eine besondere Strahlenempfindlichkeit am Übergang aus der G_1 - in die S-Phase. Je nachdem, ob der hypoxische Block in der Mitte oder am Ende der G_1 -Phase stattgefunden hat, tritt eine Sensibilisierung oder Resistenzsteigerung dieser Zellen auf.

Die Dosiseffektkurven weisen in den ersten 24 h nach Beginn der chronischen Hypoxie bei eigenen vorläufigen Versuchen an Zellen in vitro einen etwa gleichen Verlauf auf. Nach einer länger als 24 h dauernden chronischen Hypoxie erwiesen sich diese Zellen empfindlicher als die Zellen, die nach kurzer Dauer der Hypoxie bestrahlt wurden.

Die impulszyttophotometrisch nachgewiesene, relativ

gleichmäßige Verlängerung der G_1 - und S-Phase während der ersten 24 h der chronischen Hypoxie und die später beobachtete Zunahme des Anteils der möglicherweise strahlenempfindlicheren frühen S-Phasezellen (vgl. Abb. 37 30h-Werte) kann dieses Ergebnis deuten.

In einem soliden Tumor mit Zellpopulationen, die Sauerstoffkonzentrationen zwischen ca. 200 bis $\sim 0 \mu\text{M}/\text{l O}_2$ zur Verfügung haben, kann man komplizierte Verhältnisse erwarten. Nach Tannock (1972) beträgt der berechnete Diffusionsradius des O_2 von einer einzelnen Kapillare bis zu dem Punkt, an dem die O_2 -Konzentration auf den Wert Null abgefallen ist, zwischen 50 und 230 μm , je nach O_2 -Gehalt des Kapillarblutes, der Weite der Kapillare, dem Diffusionsquotienten und dem O_2 -Verbrauch der anliegenden Zellen. Wenn diese kritische Distanz überschritten wird, beginnt das anoxische Gewebe des Tumors, welches zur Nekrose übergehen kann. In den meisten experimentellen Tiertumoren beträgt diese Distanz 100 - 200 μm (u.a. Thomlinson und Gray 1955, Goldacre und Sylven 1962, Tannock 1968/70, Hug und v. Szczepanski 1969). Je nach der Gefäßversorgung, der Tumormorphologie und dem Tumoralter steigt die Zahl der hypoxischen und anoxischen Zellen bis zu 20 % aller klonogenen Zellen (vgl. van Putten und Kallman 1968). Im Mittel besitzt ein ausgewachsener solider Tumor etwa 10 % klonogene hypoxische und anoxische Zellen. Überträgt man die Ergebnisse an den Zellen in vitro und den Ascites-Tumorzellen auf die Verhältnisse im soliden Tumor, so befindet sich ein großer Teil dieser Zellen in der G_1 -Phase.

Das Ziel der Strahlentherapie ist es, alle unbegrenzt vermehrungsfähigen Tumorzellen zu inaktivieren. Wie die vorliegende und die in der Diskussion erwähnten

Arbeiten zeigen, nimmt jedoch die Zahl der klonogenen Zellen in vitro allein schon unter dem Einfluß der Hypoxie ab. Nach 48 h chronischer Hypoxie sind bei den eigenen Versuchen über 85 % aller hypoxischen und/oder anoxischen Zellen nicht mehr imstande, zur Kolonie auszuwachsen. Nach Zellumsatzmessungen von Tannock (1968/70) sowie Suit und Hewitt (1969) ist auch im soliden Tumor nach spätestens 48 h der überwiegende Anteil der hypoxischen und/oder anoxischen Zellen abgestorben, d.h. in die nekrotische Tumorregion gewandert. Der Grund für das Degenerieren der streng hypoxischen und anoxischen Zellen muß nicht unbedingt die O_2 -Abnahme im Zellmilieu sein. So verschlechtert sich neben der O_2 -Abnahme mit der Entfernung von der Blutkapillare auch die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Wie die Versuche von Sutherland und Durand (1973) am in vitro-Tumormodell zeigen, führt jedoch weniger der Mangel an Nährstoffen als der Mangel an O_2 zur verstärkten Nekrosebildung. Nach Tannock (1972) ist die berechnete Abnahme der Glukosekonzentration mit der Entfernung von dem Blutgefäß um ein Vielfaches langsamer als die gleichzeitige O_2 -Abnahme. Die Milchsäure- und Karbonatkonzentration hingegen bleibt etwa konstant. Eine niedrige Glukose- oder hohe Milchsäurekonzentration kann also nicht, wie Caspersson und Santerson (1942) annahmen, der Grund für den Zelltod von Tumorzellen sein. Versuche von Chapman u.a. (1971) an chin. Hamsterzellen zeigten, daß bei echtem Glukosemangel die Zellen einen niedrigen ATP-Pool aufweisen und in der G_1 -Phase auflaufen. Die Überlebensfähigkeit hungernder Zellen ist jedoch kaum beeinträchtigt, wie auch die Versuche an Plateau-Phasezellen in vitro gezeigt haben, wo die hungernden Zellen sogar offenbar bessere Überlebenschancen haben als gefütterte Zellen (Hahn und Little 1972). Hungernde hypoxische Zellen der Plateau-Phase sind dagegen schon in kürzester Zeit nicht mehr überlebensfähig (Röttinger, pers. Mittlg.).

Die unter hypoxischen Bedingungen verstärkte Glykolyse der Zellen kann die Energiegewinnung durch die oxydative Phosphorylierung in der Atmungskette anscheinend nicht voll ersetzen, denn auch Tumorzellen können trotz erhöhter Glykolyse im Vergleich zu Zellen normaler Gewebe bei O_2 -Mangel nicht überleben. Im Gegensatz zur Theorie von Warburg und anderen in den 30er bis 50er Jahren, nach der Tumorgewebe erhöhte Glykolyse aufweisen, weil ihre Zellatmung geschädigt ist, sollte man eher sagen, daß Tumorzellen deswegen Glukose in Milchsäure umwandeln, weil die oxydative Phosphorylierung verhindert wird.

O_2 wird jedoch nicht nur als Reduktionsäquivalent der Atmungskette gebraucht, sondern erfüllt noch weitere Funktionen in der Zelle. Dalrymple u.a. (1969) konnten z.B. zeigen, daß Zellen zwischen 2 Bestrahlungen bei Ausschaltung der Zellatmung durch Dinitrophenol (DNP) eine Erholung vom subletalen Strahlenschaden aufweisen, die der Erholung unter Normalbedingungen entspricht. Unter O_2 -freien Bedingungen fand dagegen keine Erholung statt.

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, daß O_2 eine wichtige Rolle bei der Biosynthese verschiedener Metabolite spielt (Übersicht z.B. Hayaishi und Nozaki 1969). Auch der Abbau von Aminosäuren, Lipiden, Porphyrinen usw. und vor allem von Giftstoffen wird von O_2 -übertragenden Enzymen katalysiert.

Unter hypoxischen und vor allem anoxischen Bedingungen können somit u.U. lebensnotwendige Substanzen nicht mehr hergestellt werden oder es findet eine Anhäufung von bestimmten Stoffwechselprodukten statt, die auf die Dauer toxisch wirken könnte, wie Opitz (1950) für die Entstehung der Nekrose annahm. Eine Veränderung und möglicherweise Fehlleitung des Proteinstoffwechsels in

Abhängigkeit von der Tumorregion konnten Caspersson und Santerson (1942) nachweisen. Wenn, wie Straub (1908) sagte, das Leben der Zelle auf dem labilen Gleichgewicht entgegengesetzter, gleichzeitiger, umkehrbarer, nie zu Ende laufender Reaktionen beruht, bedeutet der Übergang in das stabile Gleichgewicht den Tod. Dieser tritt nicht plötzlich und unvermittelt ein, sondern ist das Endglied einer langen Kette, die mit einer irreparablen Schädigung der normalen Zelle beginnt (Ernst 1915). Die rasche Abnahme der Überlebensfähigkeit der Zellen unter hypoxischen Bedingungen in vitro zeigt, daß diese Schädigung, das Umlenken der offenen Fließgleichgewichte in den Zellen, rasch irreversibel wird. Ein gutes Beispiel dafür bietet auch die Schädigung der Funktion des Zentralnervensystems (ZNS) schon nach wenigen Minuten des O_2 -Mangels. Muskel-, Bindegewebs- oder Tumorzellen können dagegen u.a. wegen ihrer Fähigkeit zur Glykolyse längere Zeit ohne O_2 auskommen. Schon Pasteur (1887) machte die Beobachtung, daß Hefezellen unter Anoxie ihre Morphologie verändern und degenerieren, wenn sie nicht in bestimmten Abständen wieder O_2 zur Verfügung hatten. In vitro oder in vivo sind morphologische Veränderungen erst nach mehreren Stunden offensichtlich, wenn also die irreversible Schädigung schon längst geschehen ist. Es treten Zelluntergänge auf, die durch Chromatinverdichtungen, Kernmembranschwund und ähnliches histologisch nachweisbar sind. Die Nekrobiose verläuft unspezifisch, d.h. ist morphologisch nicht zu unterscheiden z.B. von einer Strahlenschädigung oder einer hohen Temperatur- oder Säureeinwirkung.

Die Zahl der hypoxischen und anoxischen Zellen bleibt in etwa konstant, da wie gesagt laufend ein Zellumsatz

stattfindet, d.h. immer neue Zellen hypoxisch werden, während die zu diesem Zeitpunkt schon hypoxischen Zellen anoxisch werden und schließlich absterben. Wie die Kurve der Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit mit der Dauer der chronischen Hypoxie der eigenen in vitro-Versuche zeigt (vgl. Abb. 7,8), können 10 - 20 % der Zellen, die über 48 h hypoxisch sind, noch eine Kolonie bilden.

Hypoxische und anoxische Zellen sind im Vergleich zu den euoxischen Zellen einerseits strahlenresistenter. Der maximale dosismodifizierende Faktor des Sauerstoffeffekts beträgt etwa 3. Je geringer die O_2 -Konzentration im Zellmilieu während der Bestrahlung ist, desto resistenter sind die Zellen. Je länger andererseits die Zellen der chronischen Hypoxie und Anoxie ausgesetzt sind, desto geringer wird die Zahl der Überlebensfähigen, d.h. koloniebildungsfähigen Zellen. Der größte Teil der ca. 10 % koloniebildungsfähigen hypoxischen Zellen eines soliden Tumors stammt also aus einer Tumorregion, die erst kurze Zeit hypoxisch ist und sich direkt an die normal proliferierende, strahlensensiblere, euoxische Region anschließt. Das bedeutet, daß die unter Hypoxie stattfindenden Zellzyklusänderungen bei der Mehrzahl der Überlebensfähigen Zellen noch nicht sehr ausgeprägt sind. Die Zyklusabhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit der Zellen unter hypoxischen Bedingungen ist dabei die gleiche wie unter euoxischen Bedingungen (Kruuv und Sinclair 1968).

Es fragt sich, inwieweit chronisch hypoxische Zellen, deren G_1 -Phase so ausgedehnt ist, daß diese Zellen u.U. schon zu den nichtzyklisierenden, sog. Ruhe- oder G_0 -Zellen zählen, nicht doch eine größere Strahlenresistenz aufweisen, wie Anfang des Jahrhunderts Bergonié und Tribondeau (1906) postuliert hatten. Diese Zellen sind

möglicherweise strahlenresistenter als teilungsaktive Zellen der G_1 -Phase. Stimulierte Zellen des Knochens (Hayaishi und Suit 1971) oder der Leber (Coggie 1968) zeigen z.B. eine erhöhte Strahlenresistenz, wenn sie vor der Stimulierung zur Proliferation bestrahlt wurden. Wenn auch unter in vitro-Bedingungen keine Verschiebung der Zellpopulation bei länger dauernder Hypoxie in ein G_0 -Kompartiment erfolgt, kann in dem komplizierten System eines bösartigen Tumors, wo andere wachstumsregulierende Faktoren, insbesondere Tendenzen zur Differenzierung, dazukommen, nicht ausgeschlossen werden, daß ein beträchtlicher und vielleicht entscheidender Teil aller Zellen bevorzugt in hypoxischen Arealen des Tumors sich in einer G_0 -ähnlichen Zellzyklusphase befindet. Sauerstoffmangel allein löst jedoch nach den Ergebnissen dieser Arbeit diesen Prozeß nicht aus.

V. Zusammenfassung

Es wurde im Hinblick auf die Bedeutung hypoxischer Zellen für die Tumorthherapie das Proliferationsverhalten chin. Hamsterzellen unter extremer Hypoxie (weniger als $1 \mu\text{M O}_2/\text{l}$) mit folgenden Ergebnissen untersucht:

Die Rate der Zellzunahme verringert sich mit der Dauer der Hypoxie. Die Zellzahl erreicht nach 14 stündiger Hypoxie konstante Werte.

Die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nimmt exponentiell mit der Dauer der Hypoxie ab; nach 14 Stunden haben noch 10 - 15 % der Zellen ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation bewahrt.

Die Zellzyklusparameter von euoxischen Zellen und Zellen nach 14 stündiger Hypoxie wurden mittels ^3H -Thymidinmarkierung autoradiographisch untersucht und mit den Ergebnissen am Impulszytrophotometer verglichen, wobei Markierungsindex und markierte Mitosen bestimmt wurden. Dabei ergaben sich für hypoxische Zellen folgende charakteristische Veränderungen: Der Zellzyklus verlängert sich von ca. 13 h bis auf ca. 65 h. Dabei ist die S-Phase um das ca. 4fache und die G_1 -Phase um das ca. 9fache verlängert, während die G_2 -Phase kaum und die Mitosedauer ebenfalls nicht auffallend verlängert sind.

Es wurde die Auswirkung der Hypoxie auf die Zellvermehrung und die Strahlenempfindlichkeit der Zellen diskutiert. Dabei wurden vor allem die technischen Schwierigkeiten diskutiert, um völlige Anoxie oder

einen bestimmten Grad von Hypoxie in Gewebekulturen zu erreichen. Es konnte in eigenen Versuchen gezeigt werden, daß bei Bestrahlungsuntersuchungen die Ergebnisse durch die Löslichkeit des Sauerstoffes in Plastik beeinflußt werden; frühere Ergebnisse wurden in Frage gestellt.

Es wurde der Einfluß der Atmungsaktivität als begrenzender Faktor der Zellvermehrung diskutiert.

Die weitere Diskussion befaßt sich mit der Bedeutung hypoxischer Zellen für die Tumorpathologie und für die Strahlentherapie maligner Geschwülste.

Es kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß Zellen in extremer und langandauernder Hypoxie kaum mehr zum Tumorwachstum beitragen, im Gegensatz zu temporär anoxischen und hypoxischen oder bei geringen Graden der Hypoxie wachsenden Zellen.

Bei minimalen O_2 -Konzentrationen, die noch keinen Einfluß auf die Proliferationsaktivität haben, weisen die Zellen die Strahlenempfindlichkeit euoxischer Zellen auf.

Es kann außerdem gezeigt werden, daß bei Verminderung der O_2 -Konzentration die Strahlensensibilität früher abnimmt als die Vermehrungsfähigkeit der Zellen.

Chronischer Sauerstoffmangel beeinflußt die Strahlenempfindlichkeit der Zellen auch dadurch, daß sich ein großer Anteil der Zellen in strahlenresistenten Zyklusphasen befindet.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALPER, T., HOWARD-FLANDERS, P.: Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. coli B. *Nature* 178, 978 - 979 (1956).
- :Cellular radiobiology. *Ann. Rev. Nucl. Sci.* 10, 498 - 530 (1960).
- BAKER, D.J., TOWN, C.D.: Anoxia in radiobiology. *Brit. J. Radiol.* 39, 706 - 707 (1966).
- BARENDSEN, G.W.: Damage to the reproductive capacity of human cells in tissue culture by ionizing radiations of different linear energy transfer. The initial effects of ionizing radiations, ed. by HARRIS, R.J. C. New York: Academic Press 1961.
- , BROERSE, J.J.: Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-rays. I. Effects of single exposures. *Europ. J. Cancer* 5, 373 - 391 (1969).
- BARRETT, J.C.: A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitosis data. *J. natn. Cancer Inst.* 37, 443 - 450 (1966).
- BASERGA, R., GOLD, R.: The uptake of tritiated thymidine by newly transplanted Ehrlich ascites tumor cells. *Exptl. Cell Res.* 31, 576 - 585 (1963).
- :Biochemistry of the cell cycle. *Cell Tiss. Kinet.* 1, 167 - 191 (1968).
- , WIEBEL, F.: The cell cycle of mammalian cells. *Int. Rev. Exp. Path.* 7, 1 - 27 (1969).
- BEDFORD, J.: Time and dose relationship in radiation biology as applied to radiotherapy. Brookhaven symposia biol. Carmel (1969).

- BEDFORD, J.S.: The effect of prolonged hypoxia on the radiation response of mammalian cells. IV^e congrès international de radiobiologie et de physico-chimie des rayonnements, Evian: 1970 (unveröffentlichtes Manuskript).
- BELLI, J.A., ROACH, A.: "Anoxic" radiation response in cultured mammalian cells. Brit. J. Radiol. 41, 390 - 391 (1968).
- BERGONIE, J., TRIBONDEAU, L.: De quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. Comptes rendus des séances de l'académie des sciences 143, 983 - 985 (1906).
- BOAG, J.W.: Oxygen diffusion and oxygen depletion problems in radiobiology. Curr. Top. Radiat. Res. 5, 141 - 195 (1969).
- BORN, R., HUG, O.: Cell growth on plastic and glass surfaces under anoxia. Brit. J. Radiol. 43, 430 (1970).
- BROSEMER, R.W., RUTTER, W.J.: The effects of oxygen tension on the growth and metabolism of a mammalian cell. Expl. Cell Res. 25, 101 - 113 (1961).
- CASPERSSON, T., SANTESSON, L.: Studies on protein metabolism in the cells of epithelial tumours. Acta radiol. Suppl. 46 (1942).
- STURROCK, J., BOAG, J.W., CROOKALL, J.D.: Anoxia in radiobiology. Brit. J. Radiol. 41, 951 (1968).
- TODD, P., STURROCK, J.: X-ray survival of cultured Chinese Hamster cells resuming growth after plateau phase. Radiat. Res. 42, 590 - 600 (1970).
- CHAPMAN, J.D., WEBB, R.G., BORSA, J.: ATP pool levels in synchronously growing Chinese Hamster cells. J. Cell Biol. 49, 229 - 233 (1971).

- CLARK, M.E.: Growth and morphology of adult mouse fibroblasts under anaerobic conditions and at limiting oxygen tensions. *Expl. Cell Res.* 36, 548 - 560 (1964a).
- :The use of airtight culture flasks in anaerobic studies. *Experientia* 20, 292 - 293 (1964b).
- CLEAVER, J.E., HOLFORD, R.M.: Investigations of the incorporation of (³H) thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling. *Biochim. Biophys. Acta* 103, 654 - 671 (1965).
- COGGLE, J.E.: Effect of cell cycle on recovery from radiation damage in the mouse liver. *Nature* 217, 180 - 182 (1968).
- DALES, S.: Effects of anaerobiosis on the rates of multiplication of mammalian cells cultured in vitro. *Can. J. Biochem. Physiol.* 38, 871 - 878 (1960).
- DALRYMPLE, G.V., SANDERS, J.L., BAXTER, M.L., WILKINSON, K.P.: The effect of 2-4 dinitrophenol on the repair of radiation injury by HeLa-cells. *Radiat. Res.* 37, 90 - 102 (1969).
- DAVIES, R.W., BAKER, D.J.: Anoxia in radiobiology: Oxygen in polystyrene petri dishes - a further experiment. *Brit. J. Radiol.* 43, 496 - 502 (1970).
- DEFENDI, V., MANSON, L.A.: Analysis of life-cycle in mammalian cells. *Nature* 198, 359 - 361 (1963).
- DeHAAN, R.L.: Toxicity of tissue culture media exposed to polyvinyl chloride plastic. *Nature* 231, 85 - 86 (1971).
- DEL MONTE, U.: Changes in oxygen tension in Yoshida ascites hepatoma during growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125, 853 - 856 (1967).

- DENDY, P.P., CLEAVER, J.E.: An investigation of a) variation of rate of DNA-synthesis during S-phase in mouse L-cells b) effect of ultra-violet radiation on rate of DNA-synthesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 8, 301 - 315 (1964).
- DESCHNER, E.E., GRAY, L.H.: Influence of oxygen tension on X-ray-induced chromosomal damage in Ehrlich ascites tumor cells irradiated in vitro and in vivo. *Radiat. Res.* 11, 115 - 146 (1959).
- DEWEY, D.L.: Effect of oxygen and nitric oxide on the radiosensitivity of human cells in tissue culture. *Nature* 186, 780 - 782 (1960).
- DITTRICH, W., GÖHDE, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. *Z. Naturf.* 24b, 360 - 361 (1969).
- DÖRMER, P., REICHART, B., HUHN, D.: Kerntrockengewicht und Beteiligung von ^3H -Thymidin an der DNS-Synthese in Einzelzellen der regenerierenden Rattenleber. *Z. Zellforsch.* 86, 559 - 570 (1968).
- SCHMOLKE, W., MUSCHALIK, P., BRINKMANN, W.: Die DNS-Synthesegeschwindigkeit der DNS-Synthesephase von Erythroblasten der Maus in vivo. *Beitr. Path.* 141, 174 - 186 (1970).
- DREW, R.M., FAIRCHILD, R.G., ATKINS, H.L.: The oxygen enhancement ratio as measured with HeLa-cells and protracted irradiation from ^{252}Cf and ^{137}Cs . *Radio-logy* 104, 409 - 413 (1972).
- EDWARDS, J.L., KOCH, A.L., YOUCLIS, P., FREESE, H.L., LAITE, M.B., DONALDSON, J.T.: Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* 7, 273 - 281 (1960).
- ELKIND, M.M., SWAIN, R.M., ALESCIO, T., SUTTON, H., MOSES, W.H.: Oxygen, nitrogen, recovery and radiation

- therapy. Cellular Radiation Biology. Baltimore: Williams & Wilkins (1965).
- EPIFANOVA, O.J., TERSKIKH, V.V.: On the resting period in the cell life cycle. Cell Tiss. Kinet. 2, 75 - 93 (1969).
- ERNST, P.: Pathologie der Zelle; Atrophie und Aplasie. Handbuch der Allgemeinen Pathologie, 3. Bd., 372 - 396. L. Krehl und E. Marchand (ed.) Leipzig (1915).
- FRIEDKIN, M., TILSON, D., ROBERTS, D.W.: Studies of deoxyribonucleic acid biosynthesis in embryonic tissues with thymidine-C-14. J. biol. Chem. 220, 627 - 637 (1956).
- FRINDEL, E., VALLERON, A.J., VASSORT, F., TUBIANA, M.: Proliferation kinetics of an experimental ascites tumour of the mouse. Cell Tiss. Kinet. 2, 51 - 65 (1969).
- FRINDEL, E., MALAISE, E.P., ALPEN, E., TUBIANA, M.: Kinetics of cell proliferation of an experimental tumor. Cancer Res. 27, 1122-1131 (1967).
- FROESE, G.: The respiration of ascites tumour cells at low oxygen concentrations. Biochim. Biophys. Acta 57, 509 - 519 (1962).
- GIFFORD, G.E.: Some effects of anaerobiosis and the growth and metabolism of HeLa-cells. Expl. Cell Res. 31, 113 - 118 (1963).
- GOLDACRE, R.J., SYLVEN, B.: On the access of blood-borne dyes to various tumour regions. Brit. J. Cancer 16, 306 - 322 (1962).
- GOLDBLATT, H., CAMERON, G.: Induced malignancy in cells from rat myocardium subjected to intermittent anaerobiosis during long propagation in vitro. J. exp. Med. 97, 525 - 552 (1953).

- GRAFF, S., McCARTY, K.S.: Sustained cell culture. *Expl. Cell Res.* 13, 348 - 357 (1957).
- GRAY, L.H.: The initiation and development of cellular damage by ionizing radiations. *Brit. J. Radiol.* 26, 609 - 618 (1953).
- HAHN, G.M., YANG, S-J.: Plateau phase. Response and cycle events. IV^e congrès international de radio-biologie et de physico-chimie des rayonnements, Evian (1970).
- LITTLE, J.B.: Plateau-phase cultures of mammalian cells: an in vitro model for human cancer. *Curr. Top. Radiat. Res. Quart.* 8, 39 - 83 (1972).
- HALE, A.J.: Studies of the incorporation of pyrimidines into DNA in single Leucaemic and other proliferating Leucocytes. *Brit. J. Haemat.* 11, 144 - 161 (1965).
- HALL, E.J., BEDFORD, J.S., OLIVER, R.: Extreme hypoxia; its effect on the survival of mammalian cells irradiated at high and low dose-rates. *Brit. J. Radiol.* 39, 302 - 307 (1966).
- : The effect of hypoxia on the repair of sublethal damage in cultured mammalian cells. *Radiat. Res.* 49, 405 - 415 (1972).
- HARRIS, H.: The relationship between the respiration and multiplication of rat connective tissue cells in vitro. *Brit. J. exp. Path.* 37, 512 - 517 (1956).
- HARRIS, J.W., MEYSKENS, F., PATT, H.M.: Biochemical studies of cytotoxic changes during tumor growth. *Cancer Res.* 30, 1937 - 1946 (1970).
- HAYAISHI, O., NOZAKI, M.: Nature and mechanisms of oxygenases. *Science* 164, 389 - 396 (1969).
- HAYAISHI, S., SUIT, H.D.: Effect of fractionation of radiation dose on callus formation at site of fracture. *Radiology* 101, 181 - 186 (1971).

- HOLTHUSEN, H.: Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung. Untersuchungen an Askarideneiern. Pflügers Arch. ges. Physiol. 187, 1 - 24 (1921).
- HOWARD, A., PELC, S.R.: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity Suppl. 6, 261 - 273 (1953).
- HOWARD, A.: The oxygen requirement for recovery in split-dose experiments with Oedogonium. Int. J. Radiat. Biol. 14, 341 - 350 (1968).
- HOWARD-FLANDERS, P., ALPER, T.: The sensitivity of micro-organismus to irradiation under controlled gas conditions. Radiat. Res. 7, 518 - 540 (1957).
- HUDSPETH, E.R., SWANN, H.G., POMERAT, C.M.: Preliminary observations on the effect of various concentrations on the in vitro growth of spinal cord from embryonic chicks. Tex. Rep. Biol. Med. 8, 341 - 349 (1950).
- HUG, O., V. SZCZEPANSKI, L.: Cell proliferation and radio-sensitivity of transplantable animal tumours. Radiation induced cancer (IAEA symposium), 85 - 95 (1969).
- HUMPHREY, R.M., DEWEY, W.C., CORK, A.: Effect of oxygen in mammalian cells sensitized to radiation by incorporation of 5-bromedeoxyuridine into the DNA. Nature 198, 268 - 269 (1963).
- JONES, M., BONTING, S.L.: Some relations between growth and carbohydrate metabolism in tissue culture. Expl. Cell Res. 10, 631 - 639 (1956).
- KISHIMOTO, S., LIEBERMANN, I.: Expl. Cell Res. 36, 92 - 101 (1964). Synthesis of RNA and protein required for the mitosis of mammalian cells.
- KOBURG, E.: The use of grain counts in the study of cell proliferation. Cell Proliferation, ed. by L.F. Lamerton and R.J.M. Fry. Oxford: Blackwell 1963.

- KOCH, C.J., KRUUV, J.: The effect of extreme hypoxia on recovery after radiation by synchronized mammalian cells. *Radiat. Res.* 48, 74 - 85 (1971).
- , - : Measurements of very low oxygen tensions in unstirred liquids. *Analyt. Chem.* 44, 1258 - 1262 (1972).
- , - , FREY, H.E., SNYDER, R.A.: Plateau phase in growth induced by hypoxia. *Int. J. Radiat. Biol.* 23, 67 - 74 (1973a).
- , - , - : Variation in radiation response of mammalian cells as a function of oxygen tension. *Radiat. Res.* 53, 33 - 42 (1973b).
- , - , - : The effect of hypoxia on the generation time of mammalian cells. *Radiat. Res.* 53, 43 - 48 (1973c).
- KOLLMORGEN, G.M., TRUCCO, E., SACHER, G.A.: Generation cycle analysis of Chinese hamster cells by a new method and its comparison with other methods. *Expl. Cell. Res.* 47, 62 - 94 (1967).
- KOZUKA, S., MOORE, G.E.: Microcinematographic and autoradiographic study on the pattern of ^3H -thymidine uptake in the life cycle of the individual cell of the HeLa strain in vitro. *J. natn. Cancer Inst.* 36, 623 - 630 (1966).
- KRUUV, J., SINCLAIR, W.K.: X - ray sensitivity of synchronized Chinese hamster cells irradiated during hypoxia. *Radiat. Res.* 36, 45 - 54 (1968).
- LALA, P.K., PATT, H.M.: Cytokinetic analysis of tumor growth. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 56, 1735 - 1742 (1966).
- LANG, W., MÜLLER, D., MAURER, W.: Determination of thymidine metabolism in HeLa cell cultures. *Expl. Cell Res.* 44, 645 - 648 (1966).

- LANG, W., MÜLLER, D., MAURER, W.: Prozentuale Beteiligung von exogenem Thymidin an der Synthese von DNS-Thymin in Geweben der Maus und in HeLa-Zellen. *Expl. Res.* 49, 558 - 571 (1968).
- LASER, H.: Der Stoffwechsel von Gewebekulturen und ihr Verhalten in der Anaerobiose. *Biochem. Z.* 264, 72 - 86 (1933).
- LEDERER, B., KIEFER, G.: Nukleinsäuresynthese während der Interphase. *Acta histochem. Suppl.* 8, 93 - 98 (1968).
- LITTBRAND, B., RÉVÉSZ, L.: Survival of cells in anoxia. *Brit. J. Radiol.* 41, 479 - 480 (1968).
- , - : The effect of oxygen on cellular survival and recovery after radiation. *Brit. J. Radiol.* 42, 914 - 924 (1969).
- MALONEY, M.A., PATT, H.M., WEBER, C.L.: Estimation of deoxyribonucleic acid synthetic period for myelocytes in dog bone marrow. *Nature* 193, 134 - 135 (1962).
- MAURER, W., SCHULTZE, B.: Überblick über autoradiographische Methoden und Ergebnisse zur Bestimmung von Generationszeiten und Teilphasen von tierischen Zellen mit markiertem Thymidin. *Acta histochem. Suppl.* 8, 73 - 87 (1968).
- MEDAWAR, P.B.: The behaviour of mammalian skin epithelium under strictly anaerobic conditions. *Quart. J. microsc. Sci.* 88, 27 - 37 (1947).
- MICHAEL, B.D., SCOTT, O.C.H., RÉVÉSZ, L.: The removal of oxygen from a liquid medium by flushing with nitrogen. *Brit. J. Radiol.* 39, 707 - 708 (1966).
- MOORE, J.L., SMITH, C.W.: Hypoxia in radiobiology. *Brit. J. Radiol.* 43, 583 - 586 (1970).

MOTTRAM, J.C.: The role of carbon dioxide in the growth of normal and tumour cells. *Lancet* 213, 1232 - 1234 (1927).

- : A factor of importance in the radiosensitivity of tumours. *Brit. J. Radiol.* 9, 606 - 614 (1936).

MUNRO, T.R.: The influence of the oxygen : nitrogen sensitivity ratio on theoretical dose-cure relations. *Brit. J. Radiol.* 40, 619 - 626 (1967).

NIAS, A.H.W.: Clone size analysis: a parameter in the study of cell population kinetics. *Cell Tiss. Kinet.* 1, 153 - 165 (1968).

OPITZ, E.: Der Zellstoffwechsel in seiner Beziehung zur Zellstruktur. *Verh. dtsh. Ges. Path.* (33. Tagg.) 1950.

PACE, D.M., THOMSON, J.R., VAN CAMP, W.A.: *J. natn. Cancer Inst.* 28, 897 - 909 (1962).

PUCK, T.T., MARKUS, P.I., CIECUIRA, S.J.: Clonal growth of mammalian cells in vitro. *J. exp. Med.* 103, 273 - 283 (1956).

PUCK, T.T., STEFFEN, J.: Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemid and sublethal doses of X-irradiation. *Biophys. J.* 3, 379 - 397 (1963).

READ, J.: The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Part X: The dependence of the X-ray sensitivity on dissolved oxygen. *Brit. J. Radiol.* 25, 89 - 99 (1952).

REICHARD, R., ESTBORN, B.: Utilisation of deoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. biol. Chem.* 188, 838 - 846 (1951).

- RÉVÉSZ, L., LITTBAND, B.: Fractioned irradiation and the effect of oxygen. Exc. Med., Int. Congress Series No. 105, 1476 - 1481 (1965).
- , - : Qualitative differences between cellular radiation damage suffered under oxic and anoxic conditions: The dual effect of oxygen. Proc. Int. Conf. Rad. Biol. & Cancer, 67 - 76, Kyoto 1966.
- ROBBINS, E., MORRILL, G.A.: Oxygen uptake during HeLa cell life cycle and its correlation with macromolecular synthesis. J. Cell Biol. 43, 629 - 633 (1969).
- ROGERS, A.W.: Techniques of Autoradiography. Amsterdam: Elsevier Publ. Co. 1967.
- RUECKERT, R.R., MUELLER, G.C.: Effect of oxygen tension on HeLa cell growth. Cancer Res. 20, 944 - 949 (1960).
- RUTTER, W.J.: Some aspects of the regulation of growth in cell systems. Biochemistry of Morphogenesis, Vol. VI, ed. by W.J. Nicherson. New York: Pergamon Press 1960.
- SANFORD, K.K., PARSHAD, R.: Oxygen supply and neoplastic conversion of mouse embryo cells in vitro. J. natn. Cancer Inst. 41, 1389 - 1394 (1968).
- SCHWARZ, G.: Über Desensibilisierung gegen Röntgen- und Radiumstrahlen. Münch. med. Wschr. 56, 1217 - 1218 (1909).
- SHAPIRO, J.M., LUBENNIKOVA, E.I.: Population kinetics of cells in tissue culture incubated at low temperature. Expl. Cell Res. 49, 305 - 316 (1968).
- SHAW, D.H., PACE, D.M.: Recovery of cells in vitro from the effects of hypoxia and hyperoxia. J. cell Physiol. 73, 119 - 124 (1969).

- SINCLAIR, W.K., MORTON, R.A.: Variations in X-ray response during the division cycle of partially synchronized Chinese hamster cells in culture. *Nature* 199, 1158 - 1160 (1963).
- : Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat. Res.* 33, 620 - 643 (1968).
- SISKEN, J.E., KINOSITA, R.: Timing of DNA synthesis in the mitotic cycle in vitro. *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 509 - 518 (1961).
- STANNERS, C.P., TILL, J.E.: DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 406 - 419 (1960).
- STEEL, G.G.: Cell loss from experimental tumours. *Cell Tiss. Kinet.* 1, 193 - 207 (1968).
- STEVENS, K.M.: Oxygen requirements for liver cells in vitro. *Nature* 206, 199 (1965).
- STRAUB, W.: Gift und Organismus. Freiburg 1908.
- SUIT, H.D.: Radiation biology: basis for radiotherapy. Textbook of Radiotherapy, ed. by G.H. Fletcher. Philadelphia: Lea & Febinger 1966.
- , URANO, M.: Repair of sublethal radiation injury in hypoxic cells of a C3H mouse mammary carcinoma. *Radiat. Res.* 37, 423 - 434 (1969).
- SUTHERLAND, R.M., DURAND, R.E.: Hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol.* 23, 235 - 246 (1973).
- TANNOCK, J.F.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Brit. J. Cancer* 22, 258 - 273 (1968).
- : A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumours. *Cancer Res.* 29, 1527 - 1534 (1969).

- TANNOCK, J.F.: Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 30, 2470 - 2476 (1970).
- : Oxygen diffusion and the distribution of cellular radiosensitivity in tumours. *Brit. J. Radiol.* 45, 515 - 524 (1972).
- TAYLOR, J.H., WOODS, P.S., HUGHES, W. L.: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 43, 122 - 127 (1957).
- TERASIMA, T., TOLMACH, L.J.: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Expl. Cell Res.* 30, 344 - 362 (1963).
- THOMLINSON, R.H., GRAY, L.H.: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit. J. Cancer* 9, 539 - 594 (1955).
- TOBEY, R.A., ANDERSON, E.C., PETERSEN, P.F.: RNA stability and protein synthesis in relation to the division of mammalian cells. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 56, 1520 - 1527 (1966).
- , LEY, K.D.: Regulation of initiation of DNA synthesis in Chinese hamster cells. 1. Production of stable, reversible G_1 -arrested populations in suspension culture. *J. Cell Biol.* 46, 151 -157 (1970).
- VAN PUTTEN, L.M., KALLMAN, R.F.: Oxygen status of a transplantable tumor during fractionated radiation therapy. *J. natn. Cancer Inst.* 40, 441 - 451 (1968).
- WARBURG, O.: On the origin of cancer. *Science* 123, 309 - 314 (1956).

WIEBEL, F., BASERGA, R.: Cell proliferation in newly transplanted Ehrlich ascites tumor cells. Cell Tiss. Kinet. 1, 273 - 280 (1968).

WIND, F.: Versuche über den Stoffwechsel von Gewebe-explantaten und deren Wachstum bei Sauerstoff- und Glukosemangel. Biochem. Z. 179, 384 - 399 (1926).

XEROS, N.: Deoxiriboside control and synchronisation of mitosis. Nature 194, 682 - 683 (1962).

LEBENS LAUF

Reinhild Born, geboren am 7. 9. 1942 in Berlin als zweites Kind des Chemikers Dr. Hans - Joachim Born und seiner Frau Dorothea, geborene Schaefer.

Die Zeit von 1946 bis 1955 verbrachte ich in der Sowjetunion, wohin mein Vater zwangsverpflichtet worden war.

Ich besuchte dort die russische Schule.

1955 konnten wir nach Deutschland zurückkehren und lebten zunächst in Ost - Berlin und seit 1957 in München.

Hier machte ich 1962 das Abitur und studierte anschließend an der Ludwig - Maximilians - Universität Biologie.

1968 erhielt ich das Diplom für Biologie. Die Diplomarbeit führte ich bei Herrn Prof. Dr. H. J. Becker am Zoologischen Institut der Universität durch (Thema: Autoradiographische Messungen zum Vergleich der RNS - Synthesekaktivität ganzer Zellkerne einer larvalen Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster*).

Seit 1968 bin ich in Neuherberg bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung im Institut für Biologie, Abteilung Strahlenbiologie und Biophysik (Leiter: Prof. Dr. med. O. Hug), beschäftigt, während der Arbeit an der Dissertation als Stipendiatin und seit 1973 als wissenschaftlich - technische Mitarbeiterin.

